

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL CAMPOS SERRA DOMINGUES

BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE
CULTURA E PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE

CURITIBA

2009

RAFAEL CAMPOS SERRA DOMINGUES

BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS: COMPOSIÇÃO DO MEIO DE
CULTURA E PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DESCORANTE

Monografia apresentada à disciplina de Estágio
em Bioquímica como requisito parcial à
conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas, Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, Universidade Federal do
Paraná

Orientador: Prof. Dr. Jaime Paba

CURITIBA

2009

“(...)nada permanece firme em seus pés, nem conserva uma fé inabalável em si mesmo; vive-se pelo amanhã, já que o dia depois de amanhã é incerto. Tudo em nosso caminho é escorregadio e perigoso, e o gelo que ainda nos sustenta tornou-se fino: todos sentimos o hálito morno e nefasto do vento do degelo; logo ninguém será capaz de caminhar onde caminhamos. (...) Tudo é precioso para aquele que foi, por muito tempo, privado de tudo. (...)”

(Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço ao professor Dr. Jaime Paba pela orientação;

Aos professores David Mitchell, Gláucia Martinez, Joana Lea M. Silveira (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular), Vanessa Kava (Departamento de Genética), Ida Chapaval e Patrizia Dalzoto (Departamento de Patologia Básica) pela disponibilização de laboratórios, equipamentos e materiais;

A Carolina Heyse Niebisch pela ajuda e pela paciência;

Aos amigos Alberto, Anne, Bernardo, Camila Valente, Carol, David, Fábio, Fernanda, Ingrid, Kamilla, Lúcia Cristina, Poliana, a Rô da coordenação, Tião e ao Vini pelas conversas e pela amizade;

A minha avó Antonia pelo amor, pelo apoio e incentivo imprescindíveis ao sucesso em meus estudos, pela confiança e carinho; meu avô Miguel (in memoriam), minha avó Hilda, meu avô Leonel (in memoriam) e meus tios e primos pelo amor, carinho e incentivo;

Ao tio Heron, a tia Joice, e primos Caroline, Guilherme e Lucas, pelo apoio imprescindível para a minha estadia aqui em Curitiba;

Aos meus pais, Jose Luiz e Miriam Lucia, e meu irmão, Rodrigo, pelo apoio, mesmo que a distância, pelo amor, carinho e compreensão;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade e a UFPR/TN pelo auxílio financeiro

RESUMO

A poluição ambiental é um grave problema no mundo atual. A busca por desenvolvimento sustentável e manutenção dos ambientes torna as pesquisas relacionadas ao manejo de poluentes um tema cada vez mais relevante. Dentre os resíduos industriais, os corantes têxteis apresentam grande importância devido a sua toxicidade e recalcitrância. A baixa eficiência e alto custo dos métodos atualmente aplicados para a eliminação destes resíduos fazem da biodegradação uma alternativa atraente. Este projeto teve como objetivo avaliar o potencial degradador do fungo *Heteroporus biennis* e de duas cepas isoladas do ar denominadas de 002 e 003 sobre os corantes têxteis Remazol Azul, Remazol Vermelho e Remazol Amarelo através de análises espectrofotométricas e atividade enzimática. *H. biennis* e 002 mostraram grande atividade descorante, tanto em meio sólido quanto líquido, mas apenas para o Remazol Azul, enquanto que a cepa 003 mostrou atividade de bioissorção, frente aos três corantes reativos avaliados. A descoloração do Remazol Azul realizada pelo sobrenadante/eluído de culturas líquidas e sólidas de *H. biennis* e 002 sugere que a enzima responsável pela atividade descorante é secretada. *H. biennis* e 002 apresentam diferenças significativas na velocidade de descoloração quando cultivados em meios com composições diferentes de fontes de carbono e de nitrogênio. *H. biennis* cultivado com glicerol a 10g/L teve melhores efeitos descorantes do que quando cultivado no meio mínimo padrão, enquanto para a cepa 002 foi maltose a 5g/L. Escolhidas estas fontes de carbono, *H. biennis* teve o tartarato de amônia a 15g/L como melhor fonte de nitrogênio, entretanto os resultados variando-se a fonte de nitrogênio não foram melhores do que os obtidos variando-se a fonte de carbono. Para a cepa 002 a mudança da fonte de nitrogênio trouxe melhora, embora reduzida, sendo o cultivo com oxalato de amônia a 5g/l aquele com o melhor resultado. Testes de atividade enzimática foram feitos usando a oxidação do 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS) e do guaiacol, corroborando a ação de uma peroxidase dependente de manganês (MnP) como a enzima responsável pela atividade descorante em ambos os fungos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 INDÚSTRIAS DE CORANTES E TÊXTEIS	12
2.2 CORANTES	13
2.2.1 Toxicidade	16
2.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES	17
2.4 BIODEGRADAÇÃO	20
2.4.1 Fungos Lignolíticos	21
2.5 ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA – LMEs	21
2.5.1 Peroxidases	23
2.5.1.1 Manganês Peroxidase – MnP	23
2.5.1.2 Lignina Peroxidase – LiP	24
2.5.1.3 Peroxidases Versáteis – VPs	25
2.5.2 Fenoloxidas	25
2.5.2.1 Lacase – Lac	25
2.6 DESCRIÇÃO E ANTECEDENTES DO CORANTE E MICROORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO	27
2.6.1 Corante Remazol Azul (C.I. Reactive Blue 220)	27
2.6.2 Microorganismos	28
2.6.2.1 <i>Heteroporus biennis</i>	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 ESTRATÉGIA GERAL	30
3.2 ESPÉCIMES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	30
3.3 CORANTES TÊXTEIS	32
3.4 TESTES	32
3.4.1 Triagem do potencial de descoloração dos fungos para Remazol Azul, Vermelho e Amarelo	32
3.5 AVALIAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO	35
3.6 AVALIAÇÕES DAS FONTES DE NITROGÊNIO	36

3.7 PERFIL DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ZIMOGRAMA	37
3.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	38
3.8.1 Usando ABTS como único substrato	38
3.8.2 Usando Guaiacol como único substrato	39
3.8.3. Usando Remazol Azul como único substrato.....	39
3.9 ESPECTROFOTOMETRIA.....	39
4 RESULTADOS	40
5. DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

O impacto das atividades antropogênicas sobre o meio ambiente, decorrente da liberação de um amplo espectro de substâncias químicas tóxicas, vem crescendo desde o século XIX, época em que teve início à chamada revolução industrial.

Os corantes têxteis são projetados para resistir ao desbotamento frente a umidade, luz e muitos compostos químicos, incluindo agentes oxidantes, apesar de ampla diversidade de estruturas químicas, todos os corantes tem em comum o fato de não serem prontamente biodegradáveis, logo tem elevada recalcitrância. O descarte destes compostos em rios e lagos trazem uma série de problemas ambientais, o simples efeito visual de colorir o corpo líquido atrapalha a fotossíntese, além do aumento da demanda química de oxigênio, somando-se a esses fatores, muitos corantes são mutagênicos e carcinogênicos. Por isso, o setor têxtil é de especial relevância dada à natureza dos efluentes liberados, sendo classificado como um dos mais poluidores.

Os corantes conformam uma classe heterogênea de substâncias, que devido a sua estrutura química, são muito resistentes a degradação por processos bióticos ou abióticos, sendo por isso os principais responsáveis pelo alto impacto negativo dos efluentes têxteis. Quando não tratados adequadamente estes podem modificar o ecossistema, chegando a permanecer até 50 anos em ambientes aquáticos, causando sérios problemas de contaminação ambiental e toxicidade, pondo em risco inclusive a saúde humana

Atualmente os principais métodos para o tratamento dos rejeitos industriais têxteis são físico-químicos como, por exemplo, a adsorção, coagulação, precipitação, filtração e oxidação. Estes métodos, entretanto, podem facilmente causar poluição devido às altas concentrações dos produtos químicos empregados. Somando-se a isso eles também são, muitas vezes, de custo elevado, sendo que nem sempre são eficientes para tratar efluentes com corantes. Tais características

vêm estimulando as pesquisas em estratégias alternativas mais baratas, efetivas e ecologicamente corretas.

Dentro deste contexto a biodegradação (uso de processos biológicos para a degradação de substâncias químicas) desponta como uma alternativa promissora, por apresentar baixo custo, alta eficiência e apelo ecológico, oferecendo a possibilidade de retornar à natureza produtos não tóxicos resultantes da degradação dos substratos poluentes. Plantas, algas, bactérias e fungos são alguns dos tipos de organismos que apresentam potencial biodegradador descrito.

Dentro deste grupo, os fungos da “podridão branca” (WRF, sigla em inglês de *White-Rot Fungi*), também conhecidos como fungos lignolíticos, são claramente os mais eficientes degradadores de corantes sintéticos e outros poluentes. Estes microorganismos constituem um grupo ecofisiológico diverso com papel fundamental na regulação do ciclo do carbono, composto principalmente por basidiomicetos capazes de despolimerização e mineralização aeróbica de lignina.

Esta capacidade se deve a uma ou mais enzimas extracelulares modificadoras de lignina (LME, sigla em inglês para Lignin-Modifying Enzyme), as quais graças à sua baixa especificidade são capazes de atuar em outros substratos que apresentem similaridade estrutural com a lignina. Compõem o grupo das LMEs a lacase (Lac), a manganês peroxidase (MnP) e a lignina peroxidase (LiP). Alguns WRFs produzem as três LMEs, enquanto outros produzem apenas um ou dois tipos. As LMEs são essências para a degradação da lignina, mas para a mineralização da mesma há outros processos envolvendo enzimas adicionais. Tais enzimas auxiliares se encarregam da produção de H_2O_2 , substrato das peroxidases e mediadores redox difusíveis, ou ainda, participam da introdução dos esqueletos de carbono do poluente nos processos oxidativos celulares.

Apesar destes prospectos tão promissores, a aplicação da biodegradação em larga escala apresenta uma série de limitações. A presença simultânea de vários poluentes em um meio afeta a eficiência das enzimas. Somando-se a isso o alto custo para isolar e purificar enzimas assim como as condições químicas restritas

requeridas para o uso destas (pH, temperatura, força iônica, etc.). Por isso, muitas pesquisas são necessárias para identificar e testar novas linhagens de microrganismos com potencial aplicação, aprofundar o conhecimento nos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo enzimático assim como na caracterização da dinâmica do mesmo dentro do laboratório e em escala industrial.

Este projeto teve como objetivo avaliar a descoloração de dois corantes têxteis, o remazol azul e o remazol vermelho, por três isolados de fungos lignolíticos do ambiente, as linhagens denominadas 002 e 003 e um isolado de *Heteroporus biennis*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de atividade biodegradadora de corantes por três linhagens de fungos do ambiente e a dependência desta das condições de cultura *in vitro*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a produção de atividade descorante dos fungos crescendo em meio mínimo sólido e líquido;
- Determinar o crescimento dos microrganismos e produção de atividade descorante em diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio;
- Verificar se a atividade descorante encontra-se ligada ao micélio ou se esta é secretada;
- Indagar se as enzimas envolvidas no processo pertencem ao grupo das LMEs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INDÚSTRIAS DE CORANTES E TÊXTEIS

A indústria de corantes sintéticos começou em 1856, na Inglaterra, quando o químico inglês William Henry Perkin acidentalmente fez o corante lilás a partir do alcatrão de hulha. Ele construiu uma fábrica próxima a Londres para vender o primeiro corante sintético ao mundo. Alguns anos depois novos corantes, antes obtidos de plantas, começaram a ser fabricados sinteticamente.

Embora a Inglaterra tenha sido pioneira neste ramo, a Alemanha logo se tornou líder mundial, mantendo a dominância no mercado internacional até a primeira guerra mundial. Durante esse período as indústrias alemãs passaram a direcionar a produção à logística de guerra, este fato aliado com o bloqueio marítimo imposto pela Inglaterra, fez com que a disponibilidade de corantes caísse rapidamente e os preços subiram em uma proporção muito maior.

Isso chamou a atenção de vários investidores americanos. Em pouco tempo várias fábricas foram construídas nos Estados Unidos. Complexos industriais colossais emergiram como o National Aniline & Chemical Company, corporação que fez de seu dono, William G. Becker, um químico alemão, um dos homens mais ricos da década de 1920. Entretanto, a poluição gerada por sua fábrica no Brooklyn contribuiu para o fim da coleta de ostras na Jamaica, um prelúdio dos problemas ambientais que se tornaram cada vez mais ligados a indústria de corantes, que viria a erodir o apóio público que este ramo antes gozava.

Ao longo das décadas seguintes novas companhias surgiram, o crescimento da indústria de corantes teve impacto significativo no desenvolvimento da indústria química, principalmente nos EUA. Ela foi a fundação para indústrias de fármacos, polímeros, plásticos entre outros produtos.

Porém, após atingir o ápice nos anos 1970, a indústria norte americana declinou em importância e relevância. No começo dos anos 1980 as quatro maiores companhias norte americanas desse setor, cessaram a produção de corantes. A

indústria européia durou um pouco mais, mas atualmente também se encontra quase extinta, a companhia Clayton Aniline, uma fabricante de corantes desde 1876, foi fechada em 2007.

Estes eventos estão, em grande parte, relacionados aos problemas ambientais cada vez maiores que estas indústrias causaram, especialmente dos corpos de água doce. O fechamento das fabricas no primeiro mundo foi, entretanto, acompanhado pela construção de novas no terceiro mundo. Atualmente os antigos países da URSS e principalmente a Índia e a China são os maiores produtores mundiais, assim como consumidores, sendo a China a atual líder do mercado internacional desde 1995 (ISHIKAWA *et al*, 2000).

No Brasil, a produção industrial de corantes sintéticos também foi introduzida após a Primeira Guerra Mundial e atualmente supre aproximadamente 60% de sua demanda domestica (ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química, 2008), sendo que cerca de três quartos da produção nacional estão localizados na região Sul e Sudeste (GUARATINI e ZANONI, 1999).

2.2 CORANTES

Um dos maiores atrativos nos tecidos são suas cores e padrões. Há registro do uso de corantes desde os primórdios da civilização. O termo corante é geralmente usado indiscriminadamente para as tinturas (corantes sintéticos) quanto para os pigmentos. A grande diferença entre eles é a solubilidade, os corantes, ao contrario dos pigmentos, são, ou podem se tornar, solúveis em água. Na maioria dos casos, os corantes são usados para colorir produtos têxteis e papeis, enquanto que os pigmentos são usados em tintas, tatuagens, cosméticos e plásticos.

Durante o processo de tingimento de fibras, três etapas são consideradas importantes: a montagem, a fixação e o tratamento final. A montagem é a fase na qual o tecido entra em contato com a solução de corante (através de banho de tingimento) ou é impregnado com corantes através de forças mecânicas (processo de impressão ou estampa). A fixação tem como objetivo a reação entre o corante

e o tecido e, finalmente, o tratamento final envolve uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou não hidrolisado/não fixado à fibra têxtil nas etapas anteriores, sendo a quantidade de corante perdido dependente da classe a qual pertence o corante (ALCANTARA e DALTIM, 1996; GUARATINI e ZANONI, 1999; McMULLAN *et al.*, 2001).

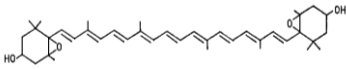
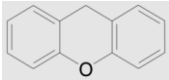
Corantes têxteis são compostos orgânicos, cuja finalidade é conferir a uma determinada fibra alguma coloração, reagindo ou não com o material durante o processo de tingimento. Eles são solúveis, não abrasivos, mostram alta capacidade de absorção luminosa. Contudo, a mesma solubilidade que confere aos corantes a capacidade de interagir com a superfície de uma fibra, pode causar toxicidade (GUARATINI e ZANONI, 1999).

A molécula de corante pode ser dividida em duas partes (Figura 1): o grupo cromóforo, que confere cor a substância, e a estrutura responsável pela fixação do corante a fibra, chamada auxocromo (KNUTZ *et al.*, 2002). Tendo em vista que muitos corantes são compostos complexos, muitas vezes é impossível traduzi-los por uma fórmula química, por este motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, utilizando-se preferencialmente os nomes comerciais.

Os corantes podem ser classificados de acordo com a origem, propriedades químicas e/ou físicas ou mesmo devido a características relacionadas ao processo de aplicação. Para identificar os corantes comercializados utiliza-se o Color Index - C.I. (Tabela 1), catálogo da “American Association of Textile Chemists and Colourists” e da “British Society of Dyers and Colourists”. O C.I. classifica os corantes de acordo com sua estrutura química (definida pelos grupos cromóforos), quando conhecida, esta organização também permite avaliar estratégias de biodegradação (WESENBERG *et al.*, 2003).

Os principais grupos de corantes classificados pelo modo de aplicação (utilização de substrato), segundo Guaratini e Zanoni (1999), são: diretos, azóicos, ácidos, a cuba, de enxofre, dispersos, pré-metalizados e reativos.

Tabela 1 – CLASSES DE CORANTES SINTÉTICOS DE ACORDO COM O COLOR INDEX.

Código	Classe Química	Fórmula
10.000	Nitroso	$R-N=O$
10.300	Nitro	$O-N=O$
11.000	Monoazo	$-N=N-$
40.800	Carotenóide	
55.000	Xantana	

FONTE: Modificado de Wesenberg *et al.*, 2003.

Os corantes reativos apresentam um grupo eletrofílico capaz de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das fibras de poliamidas. Os principais têm grupos azo ($N=N$) e antraquinona como cromóforos, além de grupos clorotriazina e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Esta classe de corantes é utilizada no tingimento de fibras naturais de algodão e lã, fibras artificiais de viscose, couro e papel. Apresentam como características alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido, quando comparado a outros tipos de corantes.

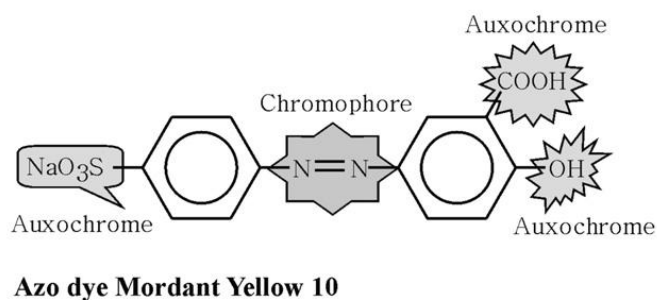


Figura 1 EXEMPLOS DE GRUPOS CROMÓFOROS E AUXOCROMOS DE CORANTES AZO E ANTRAQUINONA.

FONTE: SANTOS *et al.*, 2003

2.2.1 Toxicidade

A nível ambiental mesmo pequenas quantidades de corantes podem tornar um corpo líquido colorido. O aumento da turbidez da água impede a penetração da luz solar, diminuindo a atividade fotossintética de alguns seres, causando distúrbios na teia alimentar daquele ecossistema (NIGAM *et al.*, 2000). Foi também demonstrado a capacidade de bioacumulação em alguns seres aquáticos para alguns corantes (BAUGHMAN e PERENICH, 1999).

Os riscos associados à saúde humana estão intrinsecamente relacionados ao tempo e modo de exposição (ingestão oral, sensibilização da pele, inalação). A análise da LD₅₀ (dose letal para 50% da população) mostra que apenas um número reduzido de corantes tem toxicidade aguda (LD₅₀ < 5g/Kg) e são encontrados particularmente nos corantes bis-azo e catiônicos. Estudos farmacocinéticos mostram que a maioria dos corantes não tem potencial de bioacumulação em humanos devido às suas altas solubilidades, característica que facilita o processo de excreção, entretanto os estudos de exposição crônica mostram propriedades carcinogênicas e mutagênicas (GUARATINI e ZANONI, 1999).

Um grupo de corantes particularmente perigoso contém a função azoaromático como grupo cromóforo, o qual, quando metabolizado pelo fígado, pode levar à formação de aminas, benzidinas entre outros intermediários carcinogênicos. Os quatro principais mecanismos de biotransformação são redução, conjugação, hidrólise e oxidação, todas conduzidas no fígado (GUARATINI e ZANONI, 1999).

Um segundo grupo potencialmente carcinogênico é composto por corantes que possuem grupos amino, alquilamino ou acetilamino, sem nenhum grupo sulfonado, os quais são propensos a sofrer um processo oxidativo, levando à formação de intermediários com capacidade de interagir com o DNA (GUARATINI e ZANONI, 1999).

Finalmente, um terceiro grupo de interesse dentro desse contexto é composto pelos corantes reativos e aqueles com grupo cromóforo diazo portadores de grupos sulfonados. Embora altamente solúveis, eles são corantes configurados para

reagirem com substâncias portadoras de grupos amina e hidroxila, grupos presentes em todas as proteínas e enzimas (VENKATARAMA, 1974).

Os outros tipos de exposição a corantes, como a inalação e o contato com a pele, oferecem um risco pequeno quando comparados a ingestão oral. Dermatites de contato e manifestações clínicas de um estado de alergia respiratória costumam ser os efeitos mais freqüentes (GUARATINI e ZANONI, 1999).

A revisão da literatura a respeito deste assunto mostra que em geral os estudos de toxicidade são voltados para avaliações ambientais, sendo poucos os estudos recentes sobre os efeitos tóxicos dos corantes em populações humanas que estão expostas a efluentes contaminados com corantes têxteis. Pode-se hipotetizar que tal fato seja consequência de a maioria desses casos se encontrarem em países do terceiro mundo como a China, onde pesquisas deste tipo são raramente efetuadas, seja por motivos econômicos, seja por motivos políticos.

Na Europa, desde 1974 com a formação da ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry), várias leis foram estabelecidas para evitar o descarte destes poluentes sem prévio tratamento. A legislação ambiental do Reino Unido estabeleceu desde 1997 taxa zero de eliminação de químicos sintéticos em ambiente marinho. Diretrizes semelhantes foram adotadas pela comunidade européia (EC) e outros países desenvolvidos.

2.3 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

A variada natureza química dos corantes e o uso rotineiro de vários aditivos químicos de composição variada (umectantes, antiespumantes, dispersantes, ajustadores de pH) durante o banho de tintura, montagem e fixação, dificultam o processo de tratamento e remoção dos corantes com apenas um procedimento (ALCANTARA e DALTIN, 2006). Dentre os principais componentes presentes no efluente têxtil encontra-se matéria orgânica (carboidratos, gorduras, ácido acético, graxas), corantes, nutrientes (sais de amônia, uréia), tampões e sais (hidróxido de sódio, silicatos, sulfatos e carbonatos) e compostos tóxicos (metais pesados,

agentes redutores ou oxidantes) (RAMALHO, 2005). Existem vários métodos físico-químicos para a remoção de corantes em efluentes industriais, todos com suas vantagens e desvantagens (Tabela 2).

Tabela 2 – TÉCNICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Oxidação de Fenton	Descoloração efetiva tanto de corantes solúveis quanto insolúveis. Baixo custo de funcionamento	Geração de lodo
Ozonação	Como é aplicado na forma gasosa não consome água, não forma lodo	Meia vida do O ₃ muito curta (20min), alto custo, formação de aldeídos
Fotoquímico	Não forma lodo	Forma outros subprodutos
NaOCl	Inicia e acelera a clivagem de ligações azo	Libera aminas aromáticas
Cucurbituril	Boa adsorção de vários corantes	Alto custo
Destruição eletroquímica	Quebra dos compostos, não produz elementos tóxicos	Alto custo
Carbônio ativado	Boa remoção de grande variedade de corantes	Muito caro
Turfa	Bom absorvente devido as estruturas celulares	Superfícies de absorção são menores do que aquelas do carbono ativado
Cascas de madeira	Boa capacidade de absorção de corantes ácidos	Requer tempo muito longo de imersão
Sílica gel	Efetivo para remover corantes básicos	Reações colaterais impedem o uso comercial
Filtração com Membrana	Remove todos os tipos de corante	Produção de lodo concentrado
Troca iônica	Regeneração: sem formação de lodo	Não é efetiva para todos os corantes

Irradiação	Oxidação efetiva dos corantes (em laboratório)	Requer grandes quantidades de O ₂ dissolvido
Coagulação eletrocinética	Viável economicamente	Enorme produção de lodo

FONTE: adaptado de ROBINSON *et al.*, 2001

Os métodos químicos compreendem a reação de Fenton, ozonação, processos fotoquímicos e destruição eletroquímica. Destes, os mais utilizados são os processos oxidativos, em decorrência de sua simplicidade de aplicação. A oxidação química remove a cor dos efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes (ROBINSON *et al.*, 2001).

Os métodos físicos consistem em técnicas de remoção que empregam adsorção (onde o corante é fixado em um suporte ou resina) e troca iônica. Estes são influenciados por múltiplos fatores como superfície do sorvente, tamanho da partícula, pH, temperatura e tempo de contato (ROBINSON *et al.*, 2001).

Os métodos físico/químicos tem várias limitações, como o volume que podem tratar e, principalmente, os custos, os quais são altos mesmo para a escala laboratorial (ROBINSON *et al.*, 2001). Do ponto de vista ambiental alguns falham por produzirem compostos mais ou tão poluentes quanto os corantes, enquanto outros não promovem a mineralização (degradação completa do poluente, com concomitante produção de H₂O e CO₂), havendo uma transferência de poluentes de uma fase líquida, para outra sólida (KUMAR *et al.*, 1998).

Existe um terceiro grupo de métodos, que são os métodos biológicos. Entre eles existe o sistema de lodos ativados, adsorção por biomassa e descoloração por fungos lignolíticos e outros microorganismos.

O sistema de lodos ativados consiste na agitação dos efluentes na presença de microorganismos e ar. Este tratamento habitualmente inclui bactérias aeróbicas q em relação a remoção de cor, são ineficazes para a grande maioria dos corantes (BANAT *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2007).

A adsorção por biomassa, a qual foi denominada de biossorção (HU, 1992, 1996; TSEZOS e BELL, 1989; KUMAR *et al.*, 1998) consiste na acumulação de produtos químicos na biomassa de microorganismos. A biossorção tende a ocorrer

razoavelmente rápido mas a eficiência desse método depende grandemente das interações químicas entre o corante em questão e o tipo de microorganismo (POLMAN e BREKENRIDGE, 1996).

Os fungos lignolíticos têm sido amplamente estudados devido à capacidade de degradar uma ampla variedade de xenobióticos como agrotóxicos, explosivos, hidrocarbonetos aromáticos e corantes sintéticos. Isso se deve graças as suas enzimas modificadoras de lignina (LME). Apesar de seu amplo potencial a habilidade de usá-los em escala industrial ainda precisa ser desenvolvida (ROBINSON *et al.*, 2001). Entre os outros grupos de microorganismos passíveis de serem usados estão alguns fungos como *Neurospora crassa* e *Trichoderma sp.*, varias culturas bacterianas e algumas microalgas dos gêneros *Chlorella* e *Oscillatoria* (BANAT *et al.*, 1996).

2.4 BIODERGRADAÇÃO

Dentre as formas de eliminação de poluentes, a biodegradação vem ganhando cada vez mais destaque devido ao seu apelo ecológico. Ela consiste na modificação estrutural de substratos poluentes por diferentes organismos, levando a introdução deles no fluxo normal de nutrientes na natureza. A aplicação de processos biológicos na remoção de compostos químicos recalcitrantes na natureza é designada biorremediação (BANAT, *et al.*, 1996; GIANFREDA e RAO, 2004).

Atualmente a maioria dos organismos usados neste processo são procariotos. Os fungos lignolíticos vêm atraindo cada vez mais interesse devido as suas enzimas lignolíticas, capazes de degradar uma variedade de xenobióticos, os quais não são degradados pelos procariotos. A consolidação desse conhecimento permitira a expansão dos usos de processos biodegradativos (POINTING, 2001).

2.4.1 Fungos Lignolíticos

Os fungos lignolíticos são, na verdade, mais um grupamento fisiológico do que taxonômico. São organismos com um papel fundamental na regulação do ciclo do carbono na Terra (POINTING, 2001; WESENBERG *et al.*, 2003). São divididos em três grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca (WRF- White Rot Fungi), de podridão parda (Brown Rot Fungi) e de podridão mole (Litter rot Fungi). Dentre estes os WRFs são considerados os mais eficientes na biodegradação de poluentes (GLENN e GOLD, 1983; PASZCZYNSKI *et al.*, 1992).

A característica que mais atrai o interesse para o estudo destes são suas enzimas modificadoras de lignina (LMEs), as quais estão envolvidas não apenas na degradação da lignina, como também na de vários xenobióticos, entre estes os corantes têxteis, graças a relativa falta de especificidade por substrato assim como pela produção de mediadores redox altamente reativos produzidos pelo fungo (WESENBERG *et al.*, 2003).

2.5 ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA – LMEs

As enzimas despertam o interesse para o uso industrial devido as mesmas características que as tornam tão importantes para os seres vivos, como a capacidade de reutilização, especificidade, baixo consumo energético e velocidade de reação. Duas estratégias tem sido propostas para o uso de enzimas lignolíticas nas indústrias: a transformação direta de poluentes por culturas ativas de WRFs pré-selecionados; e o uso de enzimas extraídas/purificadas do meio de cultura (TRUPKIN *et al.*, 2003).

As LMEs são oxidoredutases capazes de degradar e mineralizar lignina. A base da baixa especificidade destas enzimas é devida a formação de radicais livres, muito reativos, passíveis de interações com múltiplos substratos (GIANFREDA e RAO, 2004). Isso permite a degradação de vários xenobióticos com similaridades estruturais com a lignina (Figura 2).

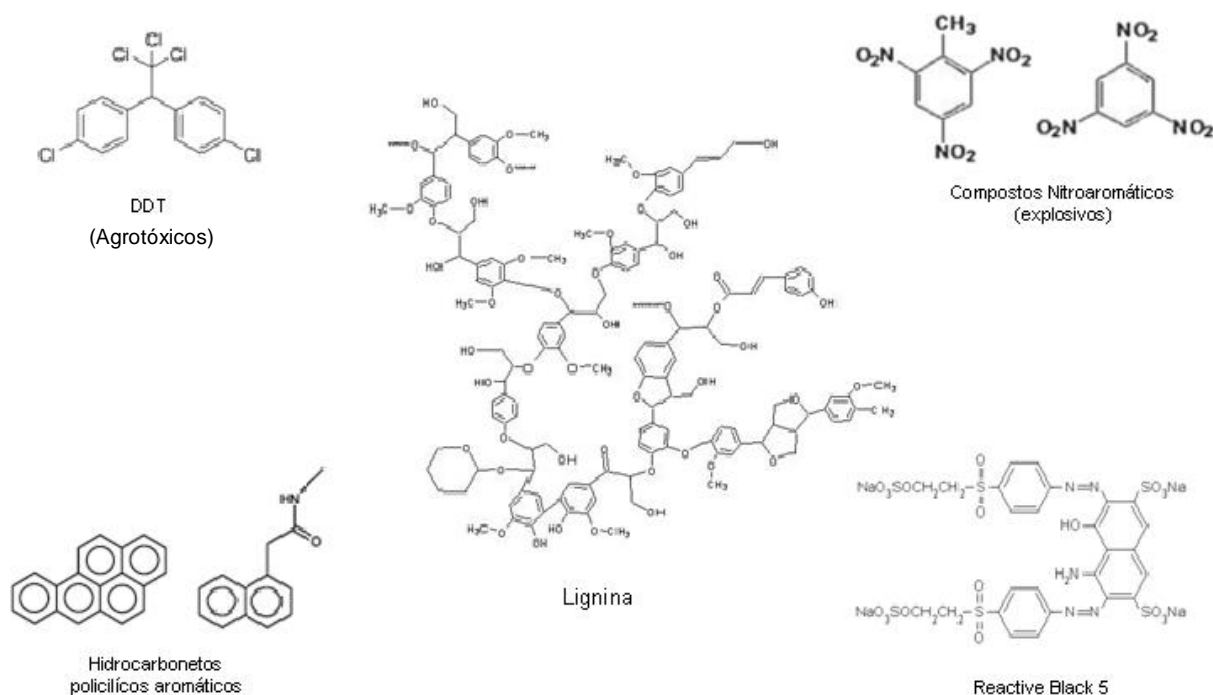


Figura 2 – SIMILARIDADES ESTRUTURAIS ENTRE UM SEGMENTO DA MOLÉCULA DE LIGNINA E ALGUNS SUBSTRATOS POLUENTES.

FONTE: O autor (2009)

A degradação da lignina, bem como dos xenobióticos, é um processo complexo de oxidação, redução, metilação e hidroxilação que envolve numerosos co-fatores de baixa massa molar, os quais podem servir como mediadores de óxido-redução (WESENBERG *et al.*, 2003).

As LMEs são freqüentemente expressas em diferentes combinações, isoformas e taxas, sob diferentes condições, sendo que a síntese e secreção delas é, freqüentemente, induzida por níveis limitados de carbono e/ou nitrogênio (WESENBERG *et al.*, 2003; GIANFREDA e RAO, 2004). Os principais membros desse grupo são as lacases (Lac, E.C.1.10.3.2), manganês peroxidase (MnP, E.C. 1.11.1.13) e lignina peroxidase (LiP, E.C. 1.11.1.14), as quais correspondem a uma fenoloxidase e duas peroxidases, respectivamente.

A natureza polimérica da lignina e o tamanho das LMEs dificultam a interação direta e específica entre estas. Por isso, moléculas com baixa massa molar agem como mediadores redox difusíveis, fornecendo alto potencial de óxido-redução para degradar a lignina e penetrar no complexo de ligninocelulose. Estes mediadores podem estar envolvidos na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e atacar direta ou indiretamente a lignina e moléculas xenobióticas. Além das LMEs,

muitos outros componentes participam desse sistema, dentre eles outras enzimas auxiliares produtoras do H_2O_2 , o qual servirá de substrato das peroxidases (WESENBERG *et al.*, 2003; POINTING, 2001).

2.5.1 Peroxidases

As peroxidases lignolíticas são a MnP e a LiP, as quais apresentam ciclo catalítico similar ao das demais peroxidases (Figura 3). Recentemente uma terceira peroxidase foi descoberta, sendo denominada de peroxidase versátil por atuar como híbrido de LiP e MnP. Os sítios de ligação com substratos são os principais responsáveis pelas diferenças funcionais destas enzimas (WESENBERG *et al.*, 2003)

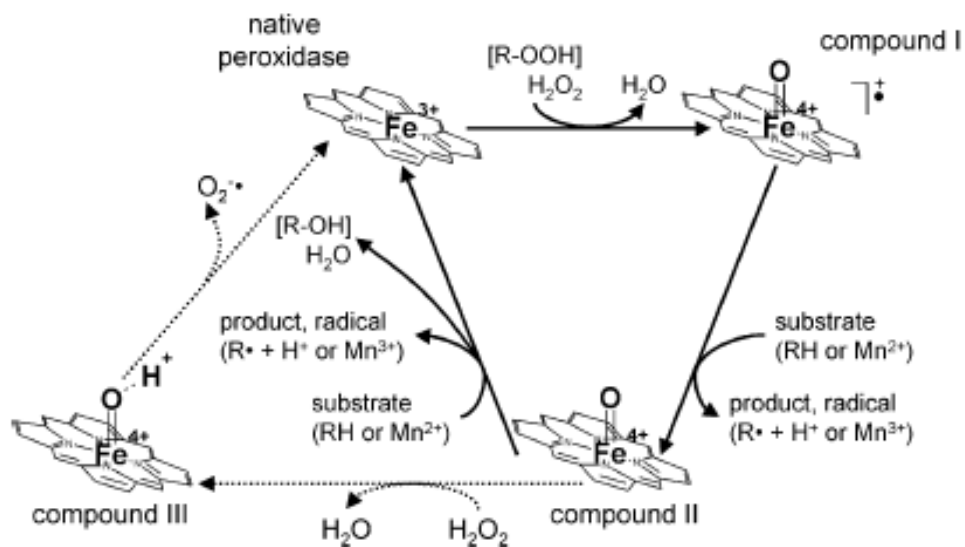


Figura 3 – ESQUEMA GENÉRICO DO CICLO CATALÍTICO DE PEROXIDASES
 FONTE: WESENBERG *et al.*, 2003

2.5.1.1 Manganês Peroxidase – MnP

O ciclo catalítico desta enzima é iniciado pela ligação de H_2O_2 à enzima nativa férrica e formação do complexo ferro-peróxido. A quebra da ligação oxigênio-

peróxido de hidrogênio requer a transferência de dois elétrons do grupamento heme da enzima, resultando na formação do composto I da manganês peroxidase e uma molécula de água. A seguir, um íon Mn^{2+} age como doador de um elétron para o composto I, formando o composto II e o íon Mn^{3+} . A redução do composto II ocorre de maneira similar à descrita acima e outro íon Mn^{3+} é formado a partir de um Mn^{2+} regenerando, deste modo a enzima nativa (CAMERON *et al.*, 2000).

O composto I é capaz de oxidar vários compostos fenólicos, enquanto a redução do composto II requer exclusivamente Mn^{2+} como substrato. Mn^{3+} é estabilizado por ácidos orgânicos secretados por vários fungos, os quais quelam e oxidam Mn^{3+} , como por exemplo, o ácido oxálico (WESENBERG *et al.*, 2003). Este quelado, age como um mediador difusível de óxido-redução, degradando esqueletos fenólicos, tióis e aminas aromáticas (WESENBERG *et al.*, 2003). Desta maneira, ácidos orgânicos são tidos como a origem de radicais centrados em carbono, radicais peroxil e superóxidos, que podem ser fonte de peróxidos para a utilização por MnP ao invés de H_2O_2 , permitindo com que fungos sem enzimas produtoras de H_2O_2 possam ser eficientes degradadores de lignina (HOFRICHTER, 2002). As MnP são as peroxidases mais comuns em quase todos os WRFs e em vários fungos da podridão mole (WESENBERG *et al.*, 2003).

2.5.1.2 Lignina Peroxidase – LiP

A LiP catalisa a oxidação de compostos não fenólicos da lignina e de substratos similares, através de várias oxidações em suas cadeias laterais pela retirada de um elétron, formando radicais reativos (WESENBERG *et al.*, 2003). Seu ciclo consiste na oxidação da enzima férrica por dois elétrons do H_2O_2 formando o composto II, que novamente oxida substratos aromáticos regenerando a enzima férrica (CAMERON *et al.*, 2000).

Os substratos para a enzima parecem ser determinados tanto pelo tamanho da molécula, quanto pelo seu potencial de óxido-redução. Seu papel na degradação da lignina parece ser o de degradar produtos formados pela ação da MnP

(WESENBERG *et al.*, 2003). A presença de um metabólito secundário facilita a oxidação do composto I. O álcool veratril é um metabólito secundário produzido por vários WRFs e após sua oxidação para radical cátion veratril age como mediador na degradação da lignina, estimulando a ação da LiP, e protegendo-a contra dano enzimático causado por H_2O_2 (WESENBERG *et al.*, 2003).

2.5.1.3 Peroxidasas Versáteis – VPs

Estas enzimas foram descritas em espécies de *Pleurotus sp.* e *Bjerkandera sp.* Agem como híbridos de MnP e LiP, oxidando Mn^{2+} , bem como compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos, incluindo corantes (HEINFLING *et al.*, 1998; MESTER e TIEN, 2000; McMULLAN *et al.*, 1998).

2.5.2 Fenoloxidasas

2.5.2.1 Lacase – Lac

Estas enzimas podem ser secretadas ou intracelulares e catalisam tanto a despolimerização quanto a polimerização de seus substratos (YOUNG *et al.*, 1995; RIVA, 2006). Lac catalisa a oxidação de uma variedade de doadores aromáticos de hidrogênio com a concomitante redução de oxigênio à água. Além disso, não oxidam somente ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também realizam descarboxilação e demetilação destes (WESENBERG *et al.*, 2003).

O sítio ativo da enzima inclui quatro íons cobre. O cobre tipo I age como doador de elétrons de fenóis e amidas substituídas (substratos típicos), enquanto o cobre tipo II transfere elétrons para oceptor final, dioxigênio, o qual é reduzido à

água. Já os dois íons cobre tipo III agem como intermediários da transferência de elétrons. Durante seu ciclo catalítico, ocorre a redução de um oxigênio molecular à duas moléculas de água e a concomitante oxidação de quatro moléculas de substratos para produzir quatro radicais livres como demonstrado na Figura 4.

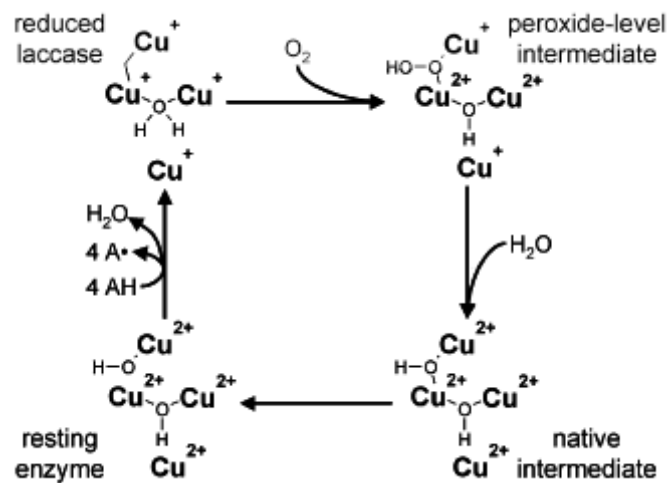


Figura 4 – CICLO CATALÍTICO DAS LACASES.
FONTE: WESENBERG *et al.*, 2003

Compostos não fenólicos podem ser oxidados pela enzima através de um composto intermediário ou mediador. Em geral, um mediador poder ser definido como uma molécula com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos. Depois de oxidado pela enzima, o mediador sai de seu sitio ativo e pode oxidar qualquer substrato que, devido ao seu tamanho, não consegue entrar diretamente no sitio enzimático. A forma oxidada do mediador é distinta estruturalmente da enzima oxidada, o que lhe permite diferentes mecanismos de oxidação, e conseqüentemente aumenta a gama de substratos suscetíveis a ação da enzima (BAIOCCO *et al.*, 2003).

Estes mediadores podem ser sintéticos ou naturais. O ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) foi o primeiro mediador natural descrito para lacases. Este permite a oxidação de dímeros não fenólicos de lignina, atuando como ponte de elétrons (EGGERT *et al.*, 1996). Segundo Wesenberg *et al.* (2003), diferentes mediadores sintéticos tem sido testados com lacases, dentre eles o ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) e o HBT (1-hidrotribenzotriazol).

2.6 DESCRIÇÃO E ANTECEDENTES DO CORANTE E MICROORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

2.6.1 Corante Remazol Azul (C.I. Reactive Blue 220)

O corante fornecido pela DYSTAR tem o nome técnico de Azul Brilhante Remazol BB 133% gran. É classificado como um corante reativo, apresenta em sua estrutura complexo de cobre e formazana e grupamento azo como cromóforo. Contem em torno de 4% de cobre, nitrogênio passível de liberação que pode contribuir para a eutrofização e compostos orgânicos fosforados. Sua estrutura química encontra-se protegida por patente.

Quanto a toxicidade pode provocar irritações na pele. A toxicidade dele foi também testada em *Daphnia magna* de acordo com a regulação FATMA nº017/02 para a avaliação de toxicidade aguda em soluções com Remazol que variavam de 50 a 1500mg/L, sendo que em todas foi constatada toxicidade aguda positiva (Immich *et al.* 2009).

Um estudo de Voncina *et al.* (2003) relata a degradação de remazol azul usando apenas ultrassom ou combinado este com H_2O_2 . Usando apenas ultrassom eles conseguiram reduzir a concentração de remazol azul de 10mg/L para 2,96mg/L, obtendo uma descoloração de aproximadamente 70% após 7h de tratamento. Combinado o tratamento anterior com o peróxido de hidrogênio 3,49mol/L eles conseguiram obter uma descoloração de aproximadamente 99% em 4h, transformando uma solução 10mg/L de remazol em uma de 0,66mg/L. Apesar dos resultados promissores a técnica ainda não foi adaptada com sucesso para ser usada em resíduos industriais.

Kurbus *et al.* (2005) avaliaram a eficiência de descoloração de três processos de oxidação avançada (H_2O_2 /UV, H_2O_2 /O₃, H_2O_2 /Fe²⁺) e os resultados mostraram o Remazol Azul como um dos corantes que mais apresentou dificuldades para degradação, sendo necessários 120 min para descoloração superior a 99% através dos processos H_2O_2 /UV, H_2O_2 /O₃ e em torno de 40min pelo processo com H_2O_2 /Fe²⁺. Porém nenhuma dessas formas reduziu significativamente o índice total

de carbono orgânico (TOC – Total Organic Carbon), o qual corresponde a quantidade de ligações entre carbonos que podem ser oxidadas a CO₂, excedendo o valor permitido. Outra desvantagem apontada pelos autores é que todos os métodos apresentam altos custos operacionais ou produzem resíduos igualmente poluentes.

Mahmoodi *et al.* (2006) conseguiu degradar uma solução 50mg/L de remazol azul usando um método fotocatalítico UV/TiO₂/H₂O₂. Ele também foi capaz de transformar o corante em minerais como CO₂, H₂O, NO⁻³ e SO²⁻. Entretanto a eficácia deste para uso em larga escala ainda não esta provada também.

A degradação deste corante por microorganismos foi descrita por Munari *et al.* (2007), os quais relataram total descoloração de uma solução 0,1g/L por culturas de *Pleurotus sajor-caju*.

2.6.2 Microorganismos

2.6.2.1 *Heteroporus biennis*

Esta espécie de fungo apresenta a seguinte classificação taxonômica

Domínio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Basidiomycota</i>
Subfilo	<i>Agaricomycotina</i>
Classe	<i>Basidiomycetes</i>
Subclasse	<i>Agaricomycetidae</i>
Ordem	<i>Poriales</i>
Família	<i>Polyporaceae</i>
Gênero	<i>Heteroporus</i>
Espécie	<i>Heteroporus biennis</i> (Bull.) Lázaro Ibiza

Recentes revisões taxonômicas, no entanto, renomearam esta espécie como *Abortiporus biennis* (Bull.) Singer. Na natureza é encontrado crescendo em árvores caídas, ou em madeira enterrada (Figura 5).



Figura 5 – FOTO DE FUNGO *Heteroporus biennis*
FONTE: www.mushroomobserver.org

Taylor e Guy (1981) citam este fungo como parasita de raízes e propoem uma metodologia de controle biológico usando bactérias anaeróbicas (*Bacillus* e *Clostridium*) em um ambiente inundado. Outro estudo, com os mesmos objetivos, relatou o uso de metabolitos de *Trichoderma spp.* e *Gliocadium virens* (BETTUCCIL *et al.*, 1988). Suay (2000) fez um estudo de varredura da atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica de vários basidiomicetos e ascomicetos. Seu trabalho identificou que *H. biennis* tem forte atividade bactericida contra *Bacillus subtilis* e alguma atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIA GERAL

A partir de uma triagem inicial dos fungos 002, 003 e *Heteroporus biennis.*, foi analisado se há descoloração do meio e se essa descoloração se dá por processos enzimáticos degradativos ou pela bio sorção do corante pelo fungo. Nos fungos em que houve atividade descorante por biodegradação, foi avaliada a sua intensidade em diferentes fontes de carbono. Determinada a melhor fonte de carbono, foi feito o mesmo teste para as fontes de nitrogênio. Finalmente, foi realizada a análise dos perfis de secreção de proteínas e de expressão da atividade descorante em cada condição de cultura testada e determinada a presença de LMEs nas mesmas.

3.2 ESPÉCIMES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Os fungos usados correspondem a uma cepa de *Heteroporus biennis*, obtida em coleta de campo e identificada pela professora Ruth Schadeck do departamento de Biologia Celular da UFPR e a duas cepas ainda sem identificação, denominadas de 002 e 003, isoladas a partir do ar, nas dependências do nosso laboratório.

As cepas foram mantidas em placas de Petri contendo aproximadamente 20mL de meio batata-dextrose (BDA), em estufa a 28°C, na ausência de luz, e repicadas a cada 30 dias, aproximadamente.

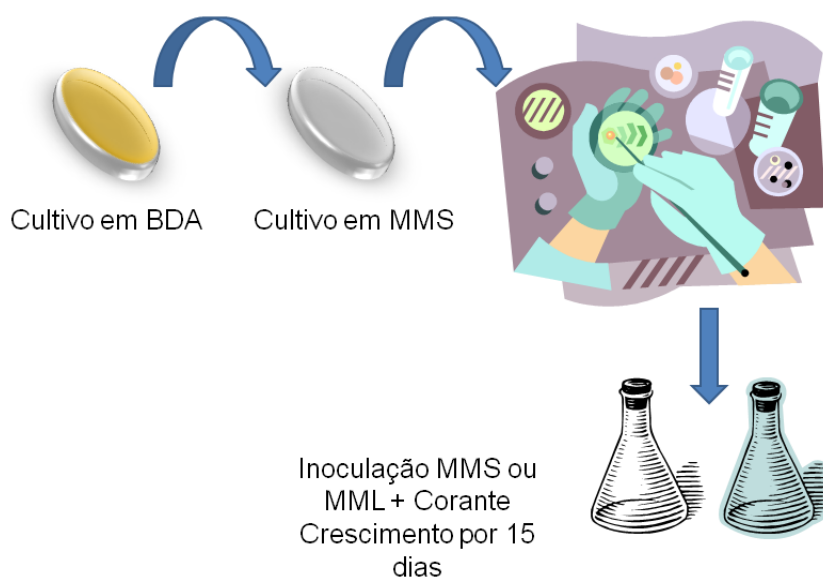
Para a utilização destes em todos os ensaios, os fungos eram inoculados em placas de Petri contendo meio mínimo sólido (MMS), cuja composição é descrita na tabela 4. Os fungos eram cultivados em um período de 7 a 10 dias. Após este tempo eram retirados da placa pequenos blocos de meio, utilizando um “punch” de biopsia de 4mm de diâmetro. Quatro destes blocos padronizados de meio eram inoculados em vidros estéreis contendo 5mL de meio de cultivo (a composição química deste meio variava de acordo com o experimento) sólido ou líquido, os quais eram incubados na estufa a 28°C na ausência de luz por 30 dias (Fluxograma 1).

Tabela 4 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA USADOS.

Componentes	MMS	MML	Meio Sais
NaNO ₃ (6,0g/L)	S	S	N
KH ₂ PO ₄ (1,5g/L)	S	S	S
KCl (0,5g/L)	S	S	S
MgSO ₄ (0,5g/L)	S	S	S
FeSO ₄ .7H ₂ O (0,01g/L)	S	S	S
ZnSO ₄ .7H ₂ O (0,02g/L)	S	S	S
Glucose (10,0g/L)	S	S	N
Ágar (10,0g/L)	S	N	N

pH 6,8

FONTE: O autor (2009)

Fluxograma 1 – MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS EM MMS E MML.
FONTE: O autor (2009).

3.3 CORANTES TÊXTEIS

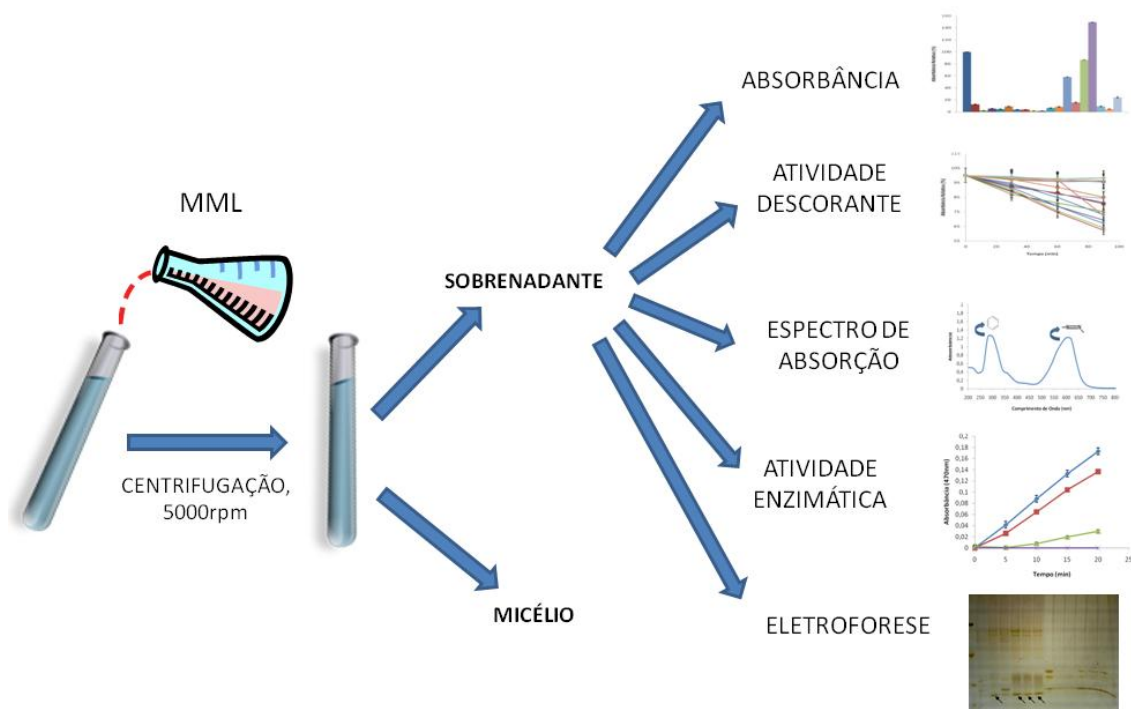
Os corantes remazol azul, amarelo e vermelho foram fornecidos pela empresa DYSTAR, (São Paulo).e correspondem respectivamente ao Reactive Blue 220, Reactive Orange 107 e Reactive Red 198. O primeiro contendo estrutura de formazana junto a complexo de cobre e o segundo e terceiro sendo corantes azóicos.

3.4 TESTES

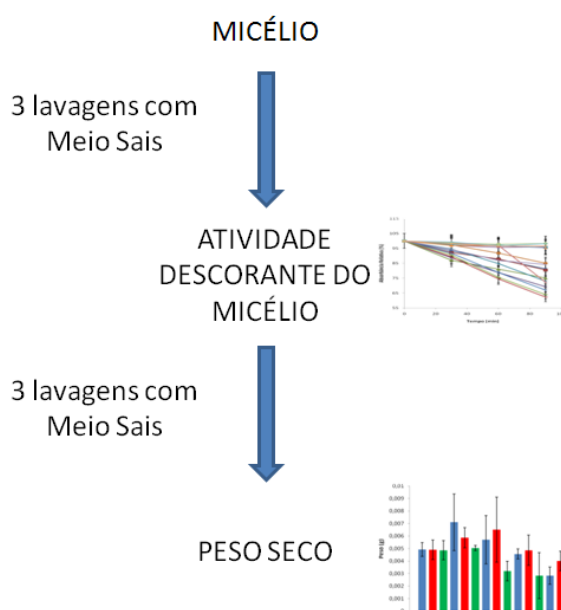
3.4.1 Triagem do potencial de descoloração dos fungos para Remazol Azul, Vermelho e Amarelo

Esta triagem foi feita utilizando duas abordagens (Fluxograma 1). Após o cultivo das cepas em placas de Petri com MMS padrão, foram retirados blocos deste meio de cultivo (plugs) utilizando o “punch”. Quatro destes plugs eram inoculados em vidros estéreis contendo 5mL de meio mínimo líquido (MML) e em vidros contendo 5mL de MMS, sendo que nestes dois últimos meios, também era acrescentado corante remazol azul na concentração de 0,1g/L.

Cada ensaio, ou seja, cada cepa de fungo em cada condição (por exemplo, fungo 002 em MMS, fungo 002 em MML, e assim por diante) foi realizada em quadruplicata com mais três controles não inoculados. Após 30 ou 15 dias de incubação na estufa de cultivo a 28°C foram feitas as análises espectrofotométricas para avaliar a descoloração.



Fluxograma 2 – ANÁLISE DOS EXPERIMENTOS DE TRIAGEM EM MML
FONTE: O autor (2009).

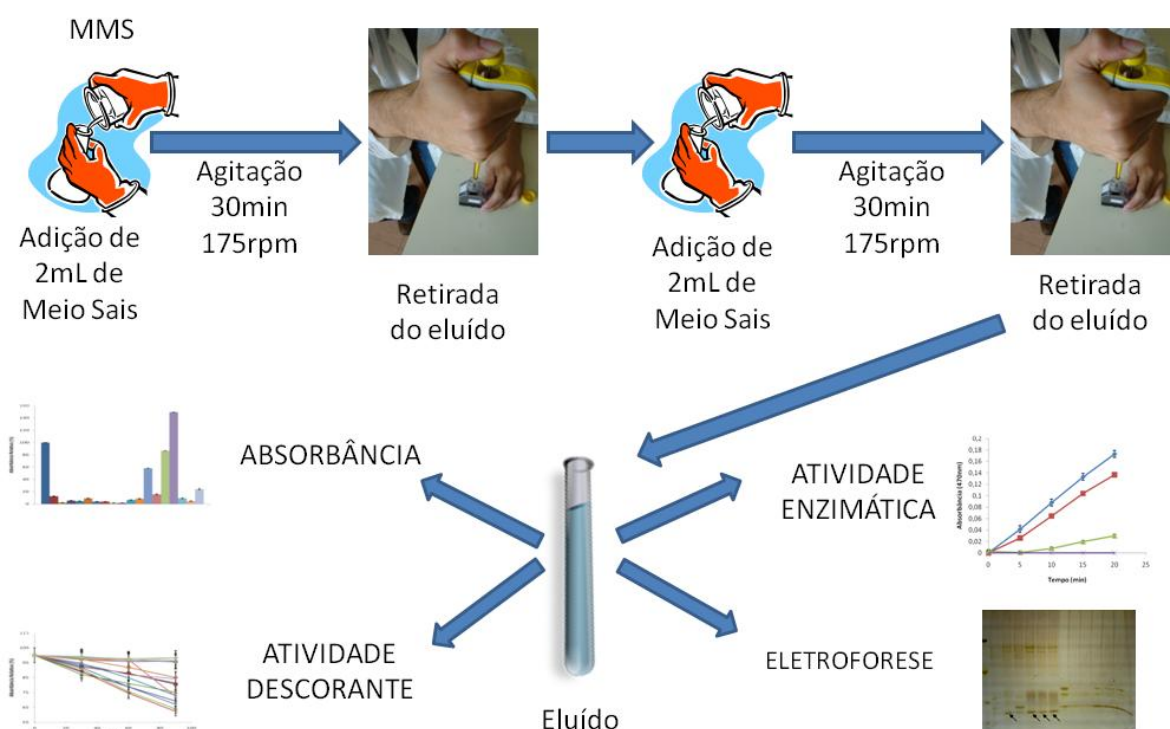


Fluxograma 3 – ANÁLISE DOS EXPERIMENTOS DE TRIAGEM EM MML
FONTE: O autor (2009).

Para os ensaios realizados em MML (Fluxograma 2 e 3), foi feita a centrifugação das amostras a 5000rpm por 5min (centrifuga Hsiangtai Machinery Ind. C. Ltda, modelo MCD-2000) e o sobrenadante era retirado para medição da

absorbância, atividade descorante, espectro de absorção e atividade enzimática (espectrofotômetro Spectrumbiol 22PC).

Para os ensaios realizados em MMS (Fluxograma 4) era feita a eluição das substâncias contidas no meio de cultivo. Tal procedimento era feito rasgando o meio de cultivo, colocando 2ml de meio sais (meio sais tem a mesma composição do MMS porém sem o NaNO_3 ; Glucose 10,0g/L e ágar bacteriológico 10,0g/L) e agitando os vidros em um agitador mecânico (CERTOMAT MO B. Braun Biotech International) por 15min a 150rpm. Após esse intervalo, era retirada a fase líquida com micropipeta automática e adicionado mais 2ml do meio de sais nos vidrinhos, que eram novamente submetidas ao mesmo procedimento de agitação. Novamente a fase líquida era retirada ao final do procedimento sendo esta submetida às análises espectrofotométricas.



Fluxograma 4 – ANÁLISE DOS EXPERIMENTOS EM MMS
FONTE: O autor (2009).

Este experimento permitiu determinar quais cepas apresentavam atividade descorante e em que tipo de meio de cultivo esta era maximizada. As fases líquidas obtidas nos experimentos que apresentaram descoloração por atividade do eluído foram guardadas no congelador para posterior caracterização do perfil de expressão protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Nas triagens dos outros corantes foram adotados exatamente os mesmos procedimentos usados para o remazol azul, a única diferença foi à troca deste pelo corante remazol vermelho ou amarelo nos vidrinhos de cultivo.

3.5 AVALIAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO

Determinado em quais fungos existia atividade descorante e o tipo de meio onde eles faziam isso com mais eficiência, foi testado o efeito de varias fontes de carbono em diferentes concentrações neste processo. Foram testadas seis fontes de carbono (glucose, sacarose, maltose, amido, frutose e glicerol) em três concentrações (5g/L; 10g/L e 15g/L).

Novamente o cultivo do fungo em placa de Petri com MMS fornecia os plugs padrões que eram inoculados em vidros estéreis contendo 5ml de meio de cultivo sólido ou líquido (Fluxograma 1), a composição destes meios era a mesma já descrita para o MMS e MML, a única variação era a substituição da glucose por uma das outras fontes de carbono citadas, bem como a variação na concentração das mesmas. Os meios ficaram encubados por 15 dias e após este período foram feitas as análises espectrofotométricas de atividade descorante. Neste experimento 1ml de sobrenadante/eluído foi retirado e misturado em um ependorf com 100µL de solução corante 1,1g/L. Tão logo as soluções eram misturadas, procedia-se com a aferição da absorbância, sendo novas medidas tomadas em intervalos de 30min, ate completar 90min (Fluxograma 2).

Todos os cultivos realizados em MML tinham a atividade descorante dos micélios testada (Fluxograma 3). Após as centrifugações era adicionado nos micélios, os quais ficavam no fundo, 4 mL de MS, essa solução era novamente centrifugada por 5min a 5000rpm e o sobrenadante era descartado. Essa lavagem foi repetida duas vezes, sendo os micélios então passados para ependorfs de 1,5mL. Nestes eram adicionados 1 mL de solução de MS e 0,1mL de solução remazol azul a 1,1g/L. Tão logo a solução corante era adicionada as aferições de absorbância eram feitas, as medições eram efetuadas a cada 30min, sendo o

intervalo de tempo observado total de 90min . Buscou-se testar se havia atividade descorante no micélio. Ao término desta atividade os micélios eram novamente lavados com MS e centrifugados, por três vezes. Após as lavagens os micélios eram secos para a aferição de seus pesos.

Para todos os cultivos realizados em MML foi feita a medição do peso seco das amostras. Nestes ensaios, ependorfs eram previamente numerados, pesados e guardados, após a separação do micélio do sobrenadante por centrifugação, o primeiro era colocado no seu respectivo ependorf numerado e posto para secar na estufa a 50°C overnight. Em seguida uma nova pesagem era feita e do novo valor era descontado o peso anterior.

3.6 AVALIAÇÕES DAS FONTES DE NITROGÊNIO

Determinada a melhor fonte de carbono, testou-se o efeito da variação da fonte de nitrogênio, também em diferentes concentrações. Foram testadas seis fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, uréia, cloreto de amônia, tartarato de amônia, oxalato de amônia e peptona.) em três concentrações 5g/L; 10g/L e 15g/L).

Este experimento foi montado à semelhança daquele realizado para as fontes de carbono. Porém, os meios de cultivo dos vidrinhos tinham o tipo de fonte de carbono e concentração desta de acordo com o determinado pelo experimento anterior variando apenas a fonte de nitrogênio. Os meios ficaram encubados por 30 dias e após este período foram feitas as análises espectrofotométricas.

Assim como para o ensaio das fontes de carbono, neste experimento todos os cultivos realizados em MML foram submetidos à verificação da atividade descorante dos micélios e foram tomados os pesos secos destes.

3.7 PERFIL DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ZIMOGRAMA

Os eluídos obtidos das triagens e dos experimentos para fonte de carbono e nitrogênio foram submetidos à eletroforese desnaturante e atividade enzimática *in gel*.

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). A concentração do gel separador foi de 12% e a do gel concentrador foi de 5%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo as orientações do fabricante (Hoefer), como descrito abaixo.

O tampão de amostras (Tris-HCl 50mM pH6,8; 100mM de DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano; glicerol 10% (v/v); SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v)) foi preparado em concentração duas vezes a normal. As amostras (140µL) foram diluídas neste tampão na proporção de 1:1. Foram aplicados 200µL de amostra nos géis para análise do perfil de secreção, 80µL nos géis para análise do zimograma. Além de 50µL do padrão de massa molar (Sigma), diluído 50 vezes, em ambos os géis. As corridas foram feitas a 250 V por 3h em tampão Tris 25mM, glicina 250mM e SDS 0,1%, pH 8,3.

O gel para análise do perfil de secreção de proteínas foi corado com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987), já o de atividade *in gel* foi submetido a 2 lavagens com água destilada durante 20min cada, seguida de 12h de incubação com solução de renaturação (tampão fosfato 0,1M pH 6,0; 1% Triton X-100) à 28°C. Após, foram realizadas três lavagens com meio sais durante 20min cada, então foi feita incubação por aproximadamente 10min em solução de meio sais contendo 10g/L de corante, tempo no qual o gel absorveu o corante. Em seguida, foi retirado o excesso de solução e este foi incubado a 28°C por no mínimo 6h.

3.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.8.1 Usando ABTS como único substrato

A atividade enzimática e a caracterização do tipo de enzima foram determinadas pelo monitoramento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)) a 420nm, em intervalos de 5min durante 10min, em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC, segundo metodologia modificada a partir de Jordann e Leukes (2003). Foram preparados três conjuntos de ensaios (Tabela 4), cada um em duplicata e com seu respectivo controle. Os componentes de cada ensaio foram preparados em soluções concentradas 10x, 200µL de cada um desses estoques eram adicionados, e um volume de 950µL de H₂O destilada era adicionada, finalmente 250µL da amostra a ser testada eram acrescentados, levando a um volume final de 2 mL. Tão logo a amostra era adicionada se fazia a leitura de absorbância, sendo esta a leitura correspondente ao tempo zero.

Tabela 4 - COMPOSIÇÃO DOS QUATRO ENSAIOS USADOS PARA CARACTERIZAR E MEDIR A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

ENSAIO	Sulfato de Manganês 20mM	H ₂ O ₂ 0,05mM	Catalase 200 U/L	EDTA 20mM	ABTS 0,05mM	Tampão Acetato (pH 5,0) 50mM
MnP	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
MiP	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Lacase	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

Modificado de Jordann e Leukes (2003).
FONTE: O Autor (2009)

3.8.2 Usando Guaiacol como único substrato

Montado exatamente como o experimento do ABTS, porém usando guaiacol a 0,05mM como substrato.e fazendo o monitoramento a 470nm.

3.8.3. Usando Remazol Azul como único substrato

Também usando o mesmo procedimento empregado para ABTS porém com Remazol Azul a 0,1g/L, o monitoramento foi realizado a 600nm, e o objetivo era avaliar em qual dos meios a atividade enzimática seria manifestada porém com a diminuição da absorbância dos meios, tal como foi feito nos experimentos de atividade descorante.

3.9 ESPECTROFOTOMETRIA

Foi realizada uma análise de espectrofotometria de varredura UV-Vis (200-800nm) em espectrofotômetro Shimadzu UV-160-A de uma solução de corante 0,1g/L e de sobrenadantes de algumas amostras mais representativas obtidas. O objetivo era analisar a degradação do corante pela diminuição da absorbância das amostras a 280nm e 600nm, que correspondem aos comprimentos de onda de máxima absorção do corante Remazol Azul. Segundo Knapp *et al.* (1995), quando a degradação ocorre há remoção completa do principal pico de luz visível ou mudanças significativas no espectro de absorbância.

4 RESULTADOS

O primeiro experimento foi o de triagem de descoloração para Remazol Azul, feita a partir de fungos incubados em MML e MMS, por trinta dias, contendo 0,1g/L do corante Remazol Azul. O objetivo desta etapa era verificar quais espécies apresentavam a capacidade de descolorir o corante substrato, e em qual meio elas o faziam melhor.

As três cepas apresentaram grande potencial de descoloração tanto no MML quanto no MMS (Gráfico 1 e Gráfico 2), entretanto a cepa 003 o fazia através da absorção do corante presente no meio, enquanto as outras duas apresentavam algum processo degradativo deste substrato (Figura 6).

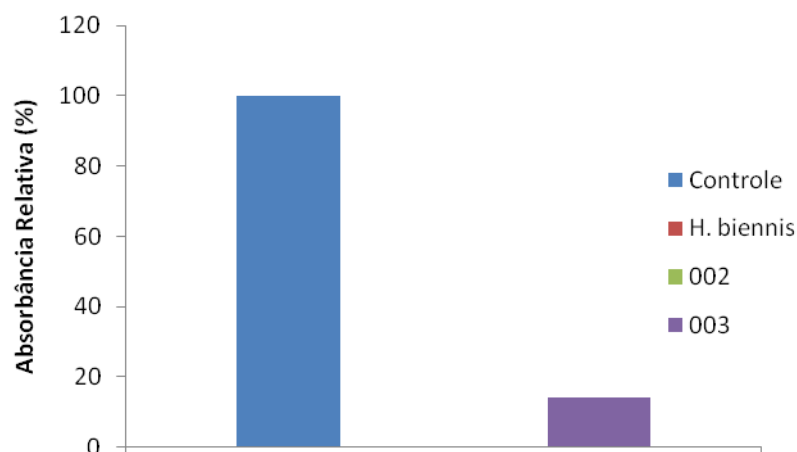


GRÁFICO 1 – TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL DOS FUNGOS EM MML. Absorbância a 600nm após 30 dias em meio mínimo líquido contendo 0,1g/L do corante.

FONTE: O autor (2009)

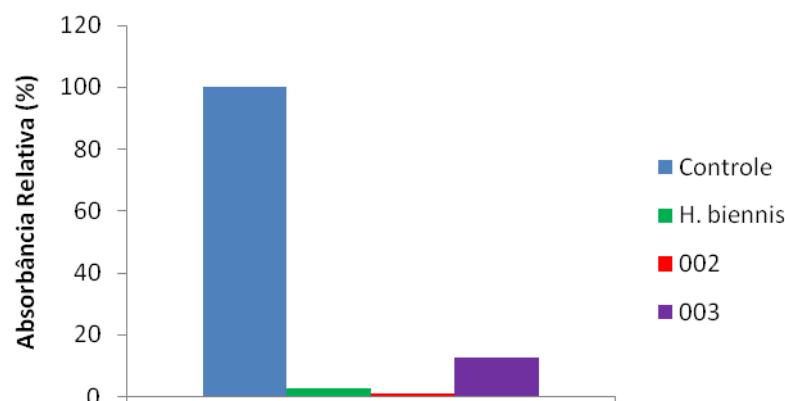


GRÁFICO 2 - TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL DOS FUNGOS EM MMS Absorbância a 600nm após 30 dias em meio mínimo líquido contendo 0,1g/L do corante.

FONTE: O autor (2009)

Após a centrifugação dos MML para a separação do sobrenadante ou da eleição dos MMS (Fluxograma 1), mediu-se a absorbância das amostras obtidas, para verificar a descoloração, resultando nos gráficos 1 e 2. A partir de uma alíquota dos sobrenadantes/eluídos obtidos foi testada a atividade descorante presente (Fluxograma 2 e 4). As cepas de *H. biennis* e 002 apresentaram boa cinética de descoloração, o sobrenadante obtido da cepa 003 não apresentou nenhuma atividade descorante (Gráfico 3), portanto a descoloração por ele promovida se deu por absorção do corante do meio.

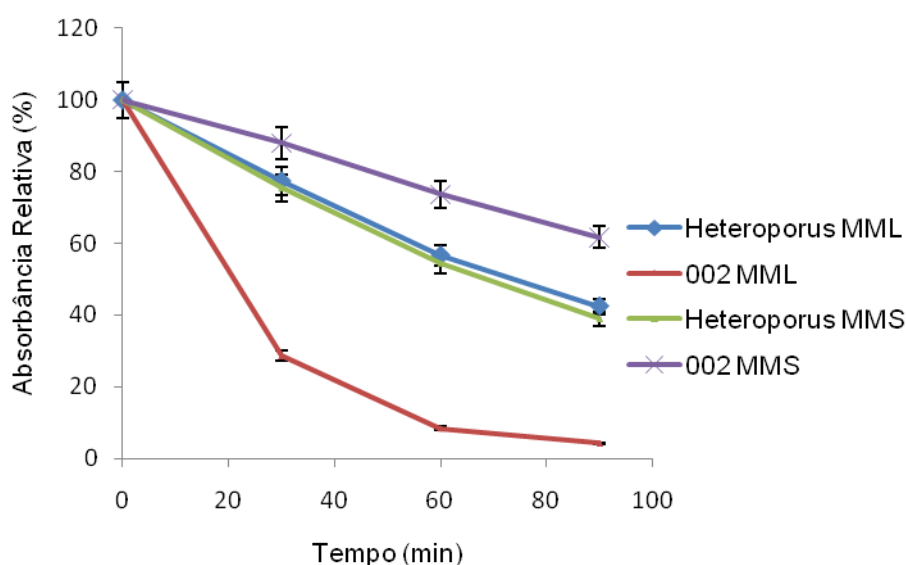


GRÁFICO 3 CINÉTICA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AZUL. Valores obtidos em 600nm a cada 30 min.

FONTE: O autor (2009)



Figura 6 – FOTO DO EXPERIMENTO DE TRIAGEM COM REMAZOL AZUL APÓS 30 DIAS DE INCUBAÇÃO. Do lado esquerdo dois controles e do lado direito amostra incubada com *H. biennis* e 002 respectivamente.
 FONTE: O autor (2009)

Foram feitos outros dois experimentos de triagem, um com Remazol Vermelho e o outro com Remazol Amarelo, cada um com amostras incubadas em MML e MMS. Estes seguiam exatamente os mesmos procedimentos já citados para o Remazol Azul.

Para esta análise, observou-se que a descoloração dos meios foi mínima, exceto para o fungo 003 (Figura 7 e 8), o qual se mostrou mais uma vez um bom absorvedor (Gráficos 4,5,6,7).

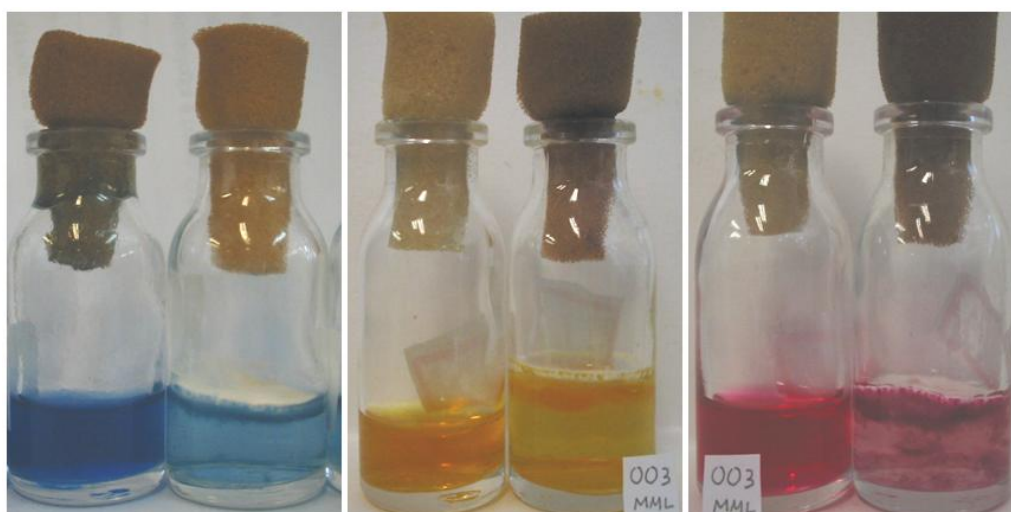


Figura 7 – FOTO DOS EXPERIMENTOS INCUBADOS COM 003.
 FONTE: O autor (2009).



Figura 8 – FOTO DOS MICÉLIOS DE 003 INCUBADOS EM MML CONTENDO CORANTE.
FONTE: O autor (2009).

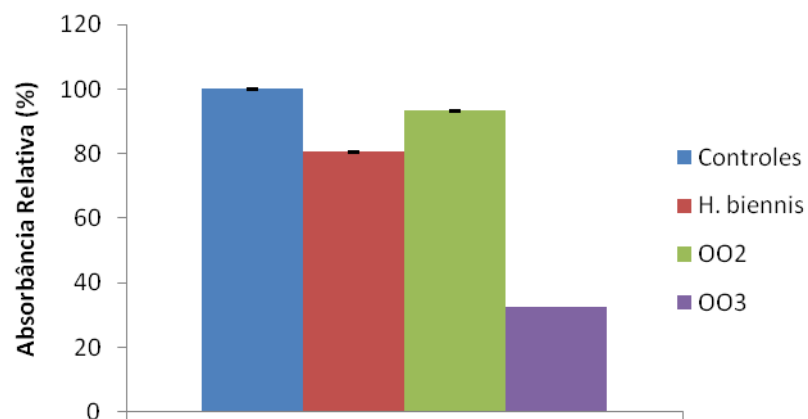


GRÁFICO 4– TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AMARELO EM MML. Absorbâncias medidas a 400nm após 30 dias em solução de MML contendo 0,1g/L do corante.
FONTE: O autor (2009)

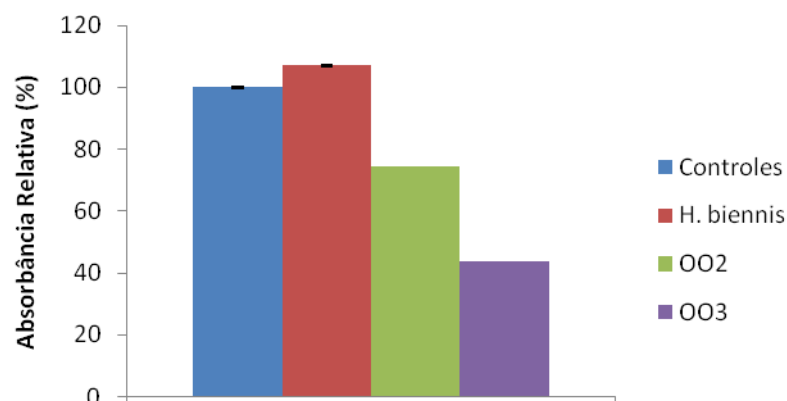


GRÁFICO 5 TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL AMARELO EM MMS. Absorbâncias medidas a 400nm após 30 dias em solução contendo 0,1g/L do corante.
FONTE: O autor (2009)

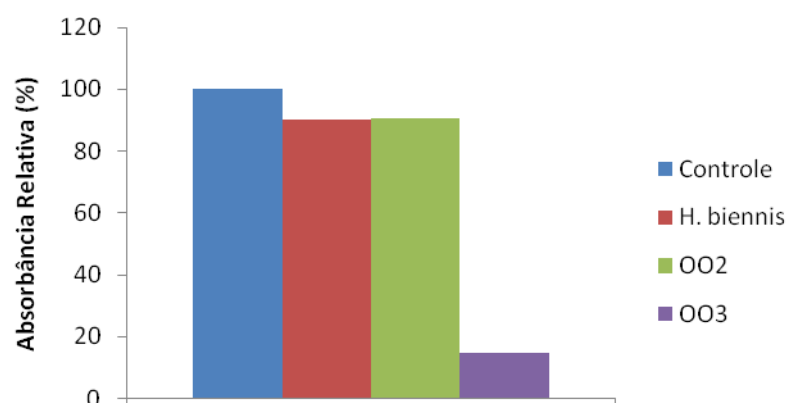


GRÁFICO 6 – TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL VERMELHO EM MML. Absorbâncias medidas a 520nm após 30 dias em solução contendo 0,1g/L do corante.
FONTE: O autor (2009)

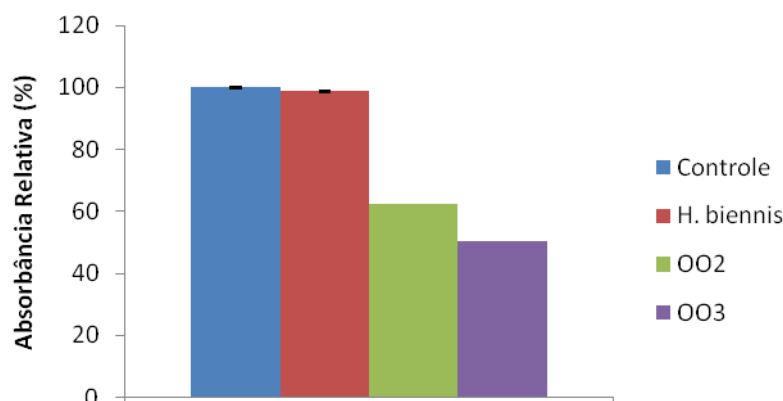


GRÁFICO 7 – TRIAGEM DO POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE REMAZOL VERMELHO EM MMS. Absorbâncias medidas a 520nm após 30 dias em solução contendo 0,1g/L do corante.

FONTE: O autor (2009)

Partindo do que foi observado no Gráfico 7, foi feita a atividade descorante do eluído das amostras de 002, entretanto não houve atividade descorante ao longo de noventa minutos de medição.

Novas tentativas foram feitas com a cepa 002 para averiguar se esta apresentaria potencial para a descoloração de remazol vermelho. Um novo experimento de triagem foi feito para 002 incubado em diferentes soluções contendo remazol vermelho a 0,1g/L. Quatro tipos de soluções foram feitas, solução BDA (39g/L), meio mínimo com três vezes a concentração usual de glucose (30,0g/L de glucose), meio mínimo com três vezes a concentração usual de nitrato de sódio (18g/L de NaNO_3) e meio mínimo com três vezes a concentração usual de glucose e nitrato de sódio. Para todas as soluções de meio mínimo foram montadas baterias com e sem ágar (MMS e MML).

Nenhum resultado foi observado em termos de descoloração, exceto um crescimento exacerbado do fungo em BDA, quando comparado com os outros meios, e a formação de um líquido escuro após 10 dias de incubação, líquido o qual acabava por escurecer toda a solução ao final dos 30 dias de incubação. Após estes resultados não foram feitas novas tentativas para obter descoloração em meios contendo remazol vermelho com a cepa 002.

Concomitantemente com esta última tentativa de descoloração do remazol vermelho, iniciaram-se os experimentos de seleção de fonte de carbono para *H.*

biennis e 002, no qual se buscou analisar se a mudança na fonte de carbono produziria alguma mudança na descoloração ou na atividade descorante.

Neste experimento, os fungos eram incubados em vidrinhos contendo 5mL de meio mínimo. A partir dos resultados observados no Gráfico 3 foram escolhidos os meios para os ensaios posteriores, os quais foram o MML para a cepa 002 e o MMS para *H. biennis*. Além da glucose, foram testadas outras 5 fontes de carbono : sacarose, maltose, amido, frutose e glicerol. Cada fonte foi testada em três diferentes concentrações: 5g/L; 10g/L e 15g/L. Cada bateria de testes foi feita em quadruplicatas com três controles para cada condição experimental, sendo o período de incubação de 15 dias.

O primeiro resultado obtido foi com o fungo 002. Após os 15 dias, o conteúdo de cada vidrinho foi centrifugado por cinco minutos a 5000rpm. O sobrenadante foi separado em tubos plásticos falcon e a partir deste foi medida a absorbância e a atividade descorante.

Ao final dos 15 dias todos os meios haviam sido descorados, como pode ser constatado pelas absorbâncias no Gráfico 8, entretanto o acompanhamento visual ao longo deste tempo mostrou que já no segundo dia de incubação os meios contendo sacarose e amido já apresentavam descoloração aparente total, os meios contendo glucose e frutose já apresentavam descoloração avançada em quase todas as réplicas em concentração de 5g/L e 10g/L enquanto que os meios contendo maltose e glicerol não apresentavam descoloração. Pelo terceiro dia quase todos, independentemente da fonte de carbono, já estavam descoloridos.

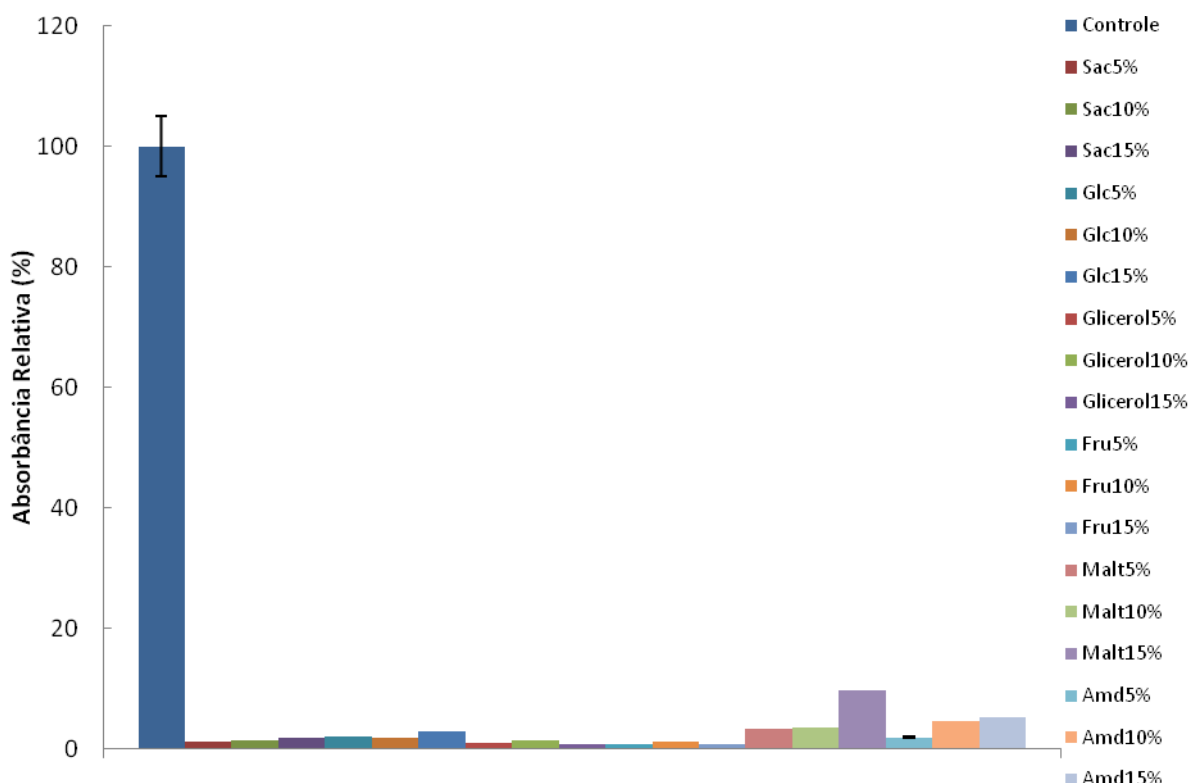


GRÁFICO 8 – ABSORBÂNCIAS RELATIVAS DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO TESTADAS PARA 002. Absorbâncias medidas a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MML com 0,1g/L de corante remazol azul. Os números sobre as colunas indicam os desvios padrão das amostras.

FONTE: O autor (2009)

A medição da atividade descorante ao longo do tempo seguiu o protocolo já citado e revelou um padrão diferente do esperado pela observação da descoloração visual. Os meios contendo maltose e amido, ambos a 5g/L, se mostram os melhores nesta observação, reduzindo a absorbância relativa dos meios em quase 90% após 30min (Gráfico 9 e 10). Os micélios não apresentaram atividade descorante, exceto os micélios obtidos nos meios de maltose 10g/L e 15g/L, os quais levaram a um padrão de descoloração bem acentuado, entretanto, foi especulado que este resultado se deve ao grande tamanho que estes micélios desenvolveram nestes meios, o que pode ter aprisionando pequenos volumes do sobrenadante, que as lavagens não conseguiram remover.

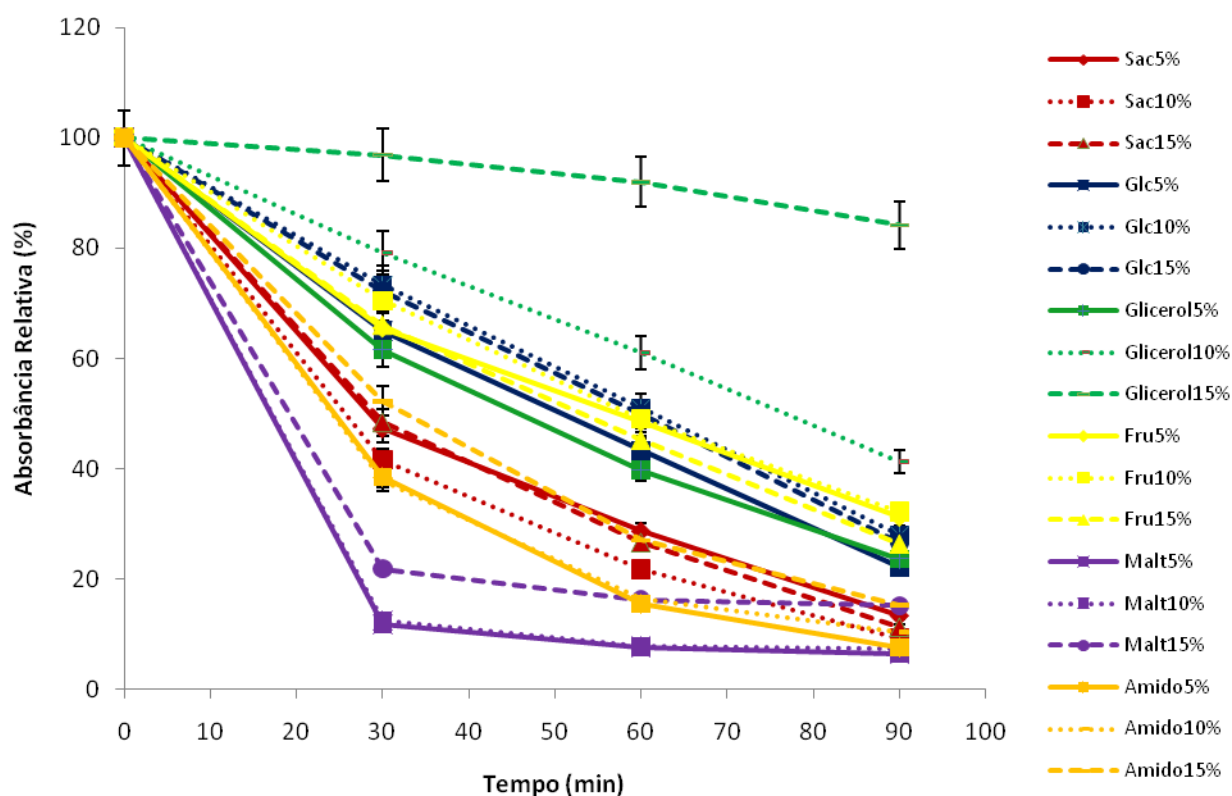


GRÁFICO 9 – ATIVIDADE DESCORANTE DOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES MEIOS DE CARBONO OBTIDOS EM INCUBAÇÃO COM A CEPA DE FUNGO 002. A absorbância foi medida a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MML contendo 0,1g/L de corante remazol azul. FONTE: O autor (2009).

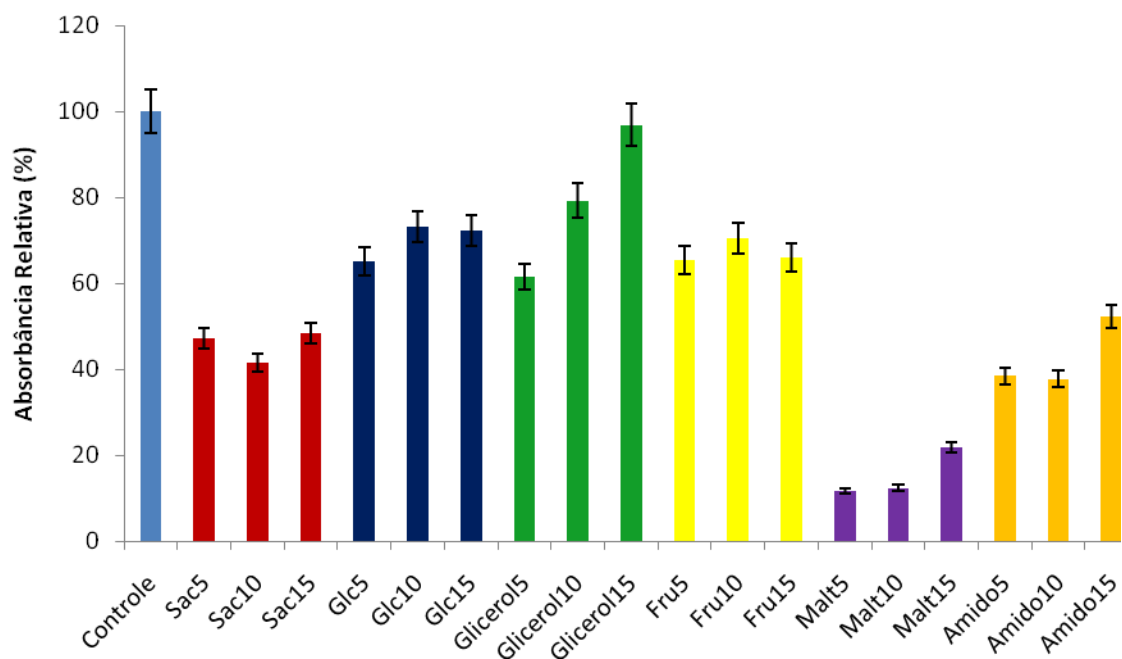


GRÁFICO 10 – HISTOGRAMA COMPARATIVO DAS ABSORBÂNCIAS MEDIDAS NO TEMPO 30 MINUTOS PARA CADA FONTE DE CARBONO. Gráfico para 002. FONTE: O autor (2009).

Visualmente os micélios dos meios mais concentrados eram maiores em tamanho do que os micélios dos meios menos concentrados, entretanto a análise dos pesos secos não confirmou essa relação para a maioria das fontes exceto amido (Gráfico 11). Os desvios padrão das amostras são muito grandes e a dosagem das proteínas, junto com um novo experimento com mais repetições talvez sejam necessários para poder determinar se há relação entre fontes de carbono e nitrogênio, crescimento e atividade decolorante..

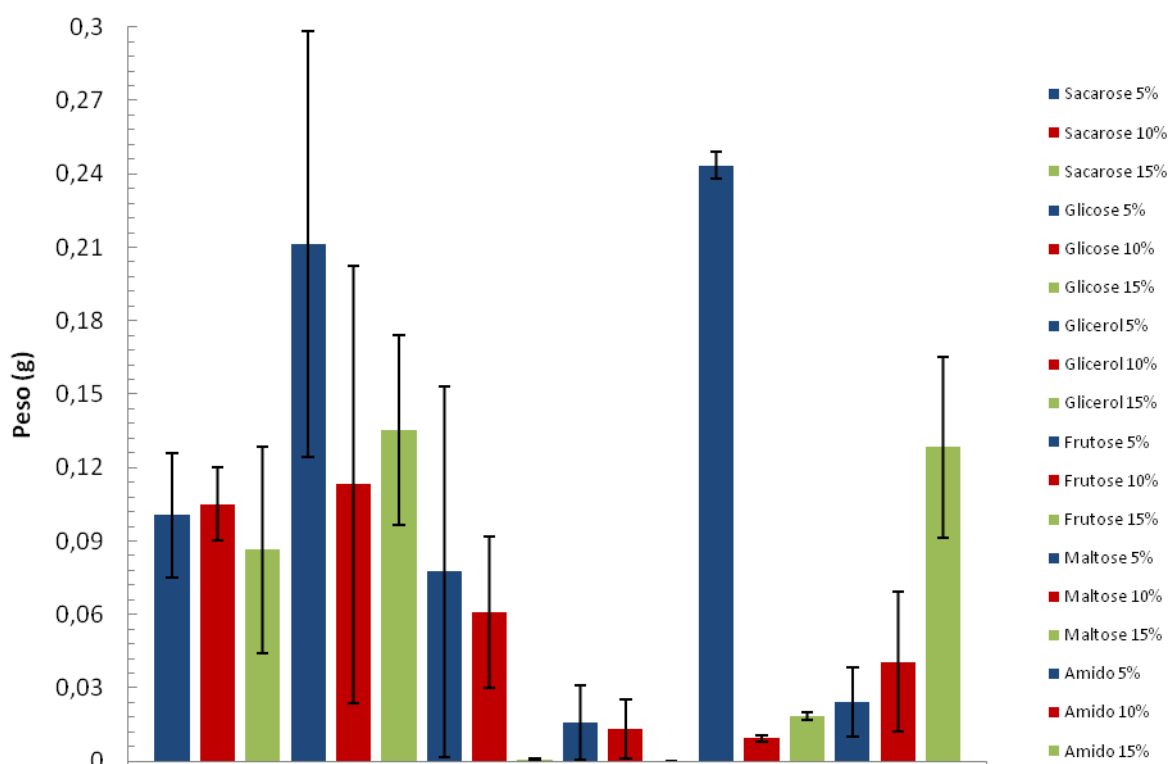


GRÁFICO 11 - PESOS SECOS DOS MICÉLIOS LAVADOS, OBTIDOS A PARTIR DO EXPERIMENTO DE FONTES DE CARBONO PARA 002 EM MML.
 FONTE: O Autor (2009).

Em seguida foi feita a análise do experimento de fontes de carbono com *H. biennis* após 15 dias de incubação. Como a triagem determinou que para este fungo o crescimento em MMS produzia melhores resultados para descoloração, este foi utilizado e o procedimento de análise para MMS foi o mesmo já descrito.

Mais uma vez, ao final dos 15 dias a medição das absorvâncias mostrou que todos os meios foram descolorados (Gráfico 12), entretanto a observação visual mostrou que este processo ocorreu em tempos diferentes. Ao terceiro dia já havia descoloração total dos meios com amido, frutose, glucose e sacarose em

concentração de 5g/L e 10g/L, os outros meios apresentavam descoloração parcial enquanto que para o glicerol não havia descoloração alguma. Ao quarto dia todos estavam praticamente sem cor. Entretanto, as amostras não seguiram esse padrão de velocidade de descoloração no teste de atividade descorante (Gráfico 13 e 14).

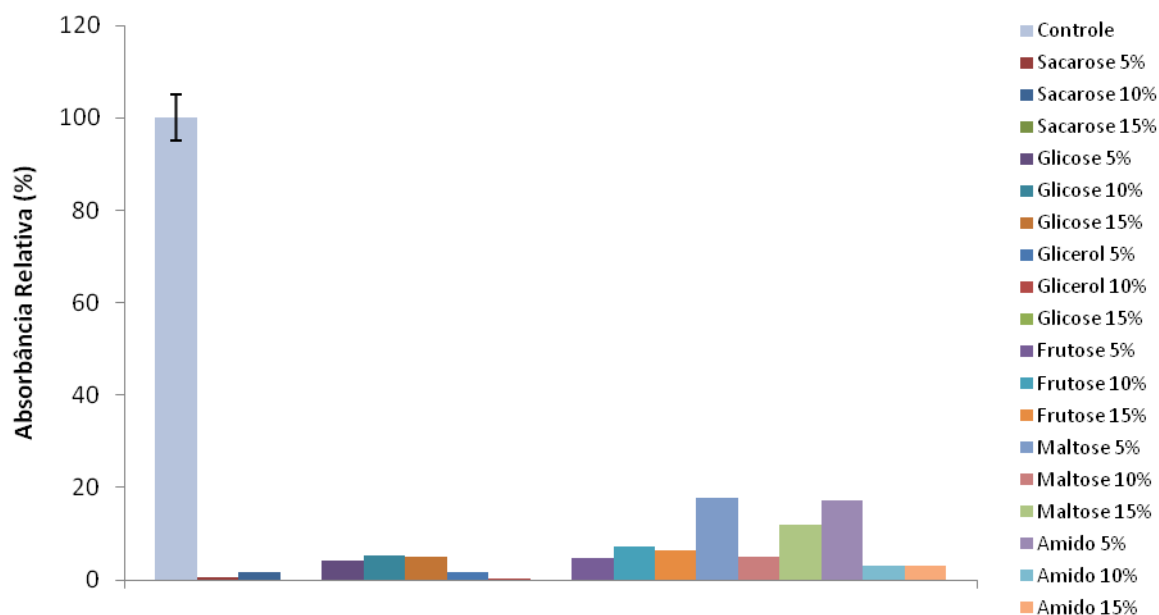


GRÁFICO 12 – ABSORBÂNCIA RELATIVA DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO PARA *H. biennis*. Absorbâncias medidas a 600nm após 15 dias de incubação em solução com 0,1g/L de corante remazol azul.

FONTE: O autor (2009).

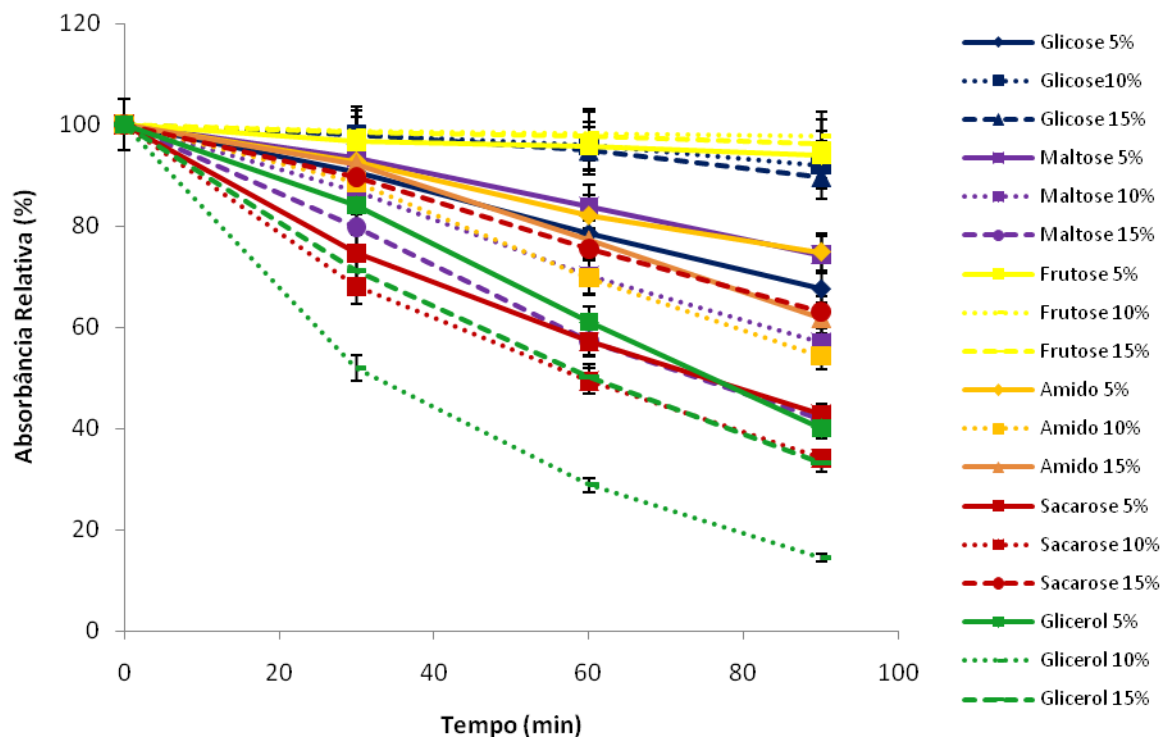


GRÁFICO 13 - ATIVIDADE DESCORANTE DOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES MEIOS DE CARBONO OBTIDOS EM INCUBAÇÃO COM *H. biennis*. A absorbância foi medida a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MMS contendo 0,1g/L de corante remazol azul.
FONTE: O autor (2009).

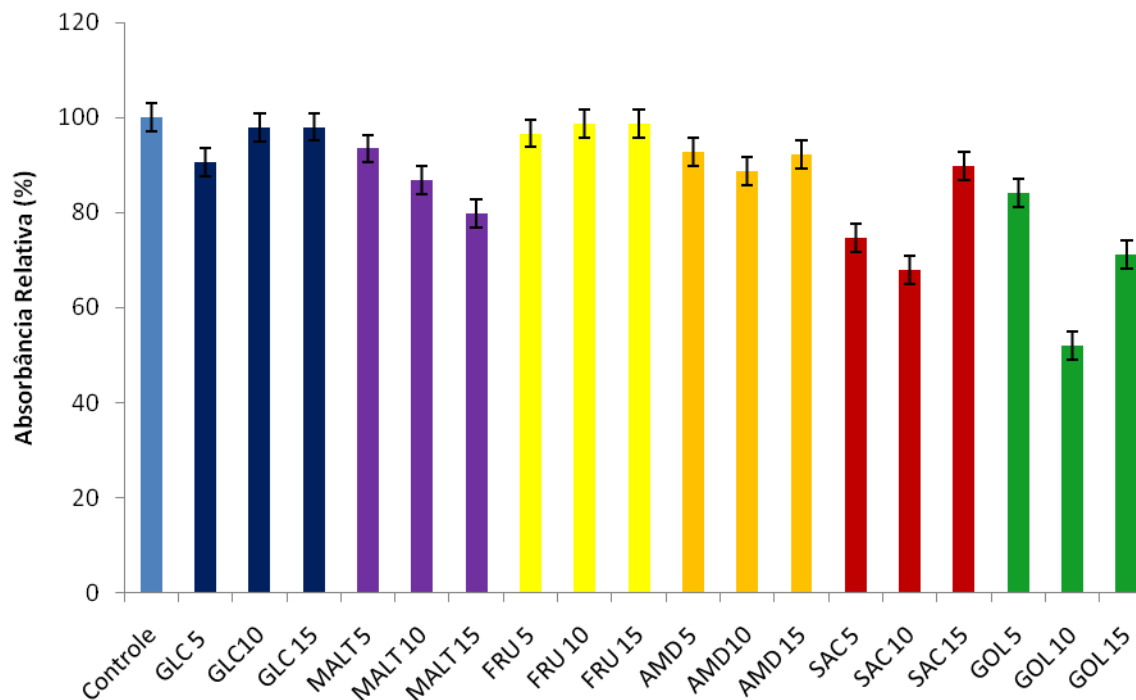


GRÁFICO 14 - HISTOGRAMA COMPARATIVO DAS ABSORBÂNCIAS MEDIDAS NO TEMPO 30 MINUTOS PARA CADA FONTE DE CARBONO. Gráfico para *H. biennis*.
FONTE: O autor (2009).

Após verificar a influencia da mudança da fonte de carbono no comportamento descorante dos fungos, verificou-se a influência da mudança na fonte de nitrogênio. Foram testadas seis fontes, cada uma em três concentrações diferentes: 5g/L, 10g/L e 15g/L. As fontes testadas foram nitrato de sódio (NaNO_3), cloreto de amônia (NH_4Cl), tartarato de amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$), oxalato de amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) e peptona bacteriológica.

Começou-se com a cepa 002, crescida por 15 dias em MML. Para ela foram montados dois conjuntos de experimentos, baseado nos resultados obtidos com os testes de fontes de carbono, em um usou-se como fonte de carbono o amido e em outro a maltose, ambos a 5g/L.

O experimento usando amido como fonte de carbono e variando-se as fontes de nitrogênio foi o primeiro a ser analisado. A descoloração visual foi extremamente rápida, já no segundo dia todos os meios estavam sem a cor azul, exceto os meios com oxalato de amônia e uréia os quais apresentavam descoloração parcial, e os meios contendo peptona que continuavam azuis. Ao final dos 15 dias todos estavam descorados exceto os meios contendo uréia e peptona. A peptona mostrou-se particularmente difícil de analisar, pois freqüentemente os meios contendo esta substância perdiam a cor azul, ficando esverdeados ou amarelados logo após o processo de autoclavagem, ou seja, antes mesmo de receberem os plugs de fungos. Só foram analisados os meios que não sofreram esta alteração.

A análise da absorbância a 600nm mostrou forte descoloração em todos os meios exceto naqueles com uréia e peptona (Gráfico 15). A atividade descorante mostrou que o sobrenadante dos meios com oxalato de amônia 5g/L e tartarato de amônia 10g/L foram os mais eficientes, levando a uma descoloração quase total em 30 minutos (Gráfico 16 e 17).

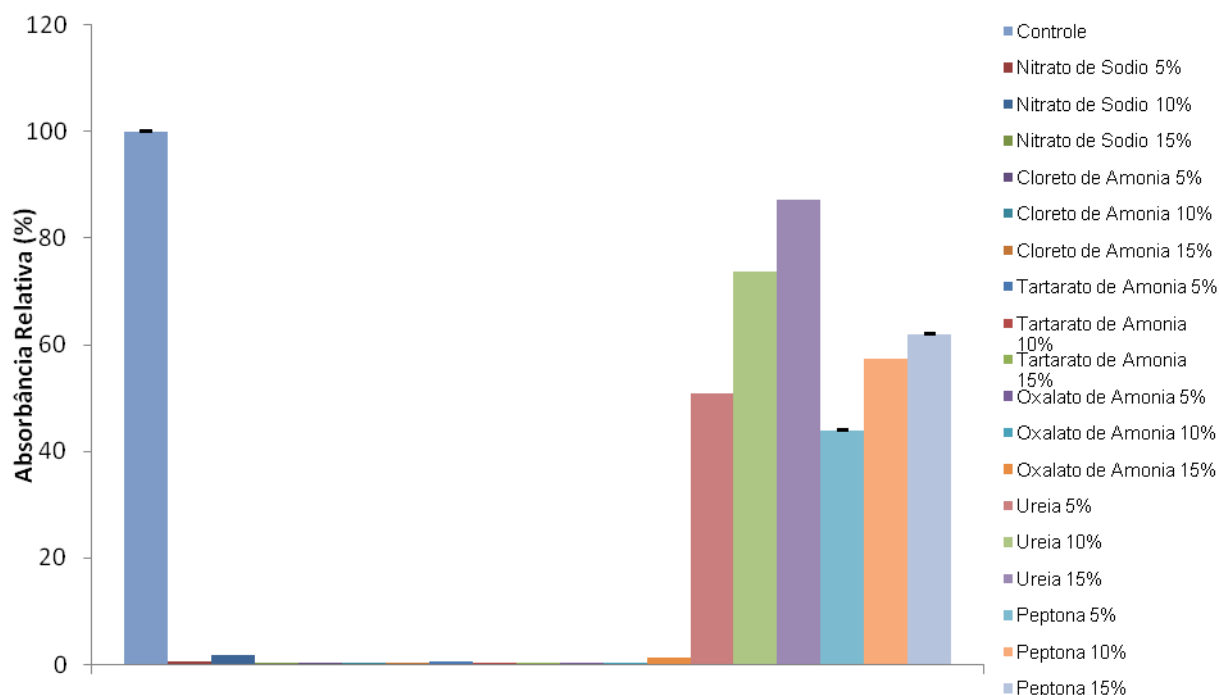


GRÁFICO 15 - ABSORBÂNCIA RELATIVA DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO PARA 002 USANDO AMIDO 5g/L COMO FONTE DE CARBONO. Absorbâncias medidas a 600nm após 15 dias de incubação em solução com 0,1g/L de corante remazol azul em MML.
FONTE: O autor (2009).

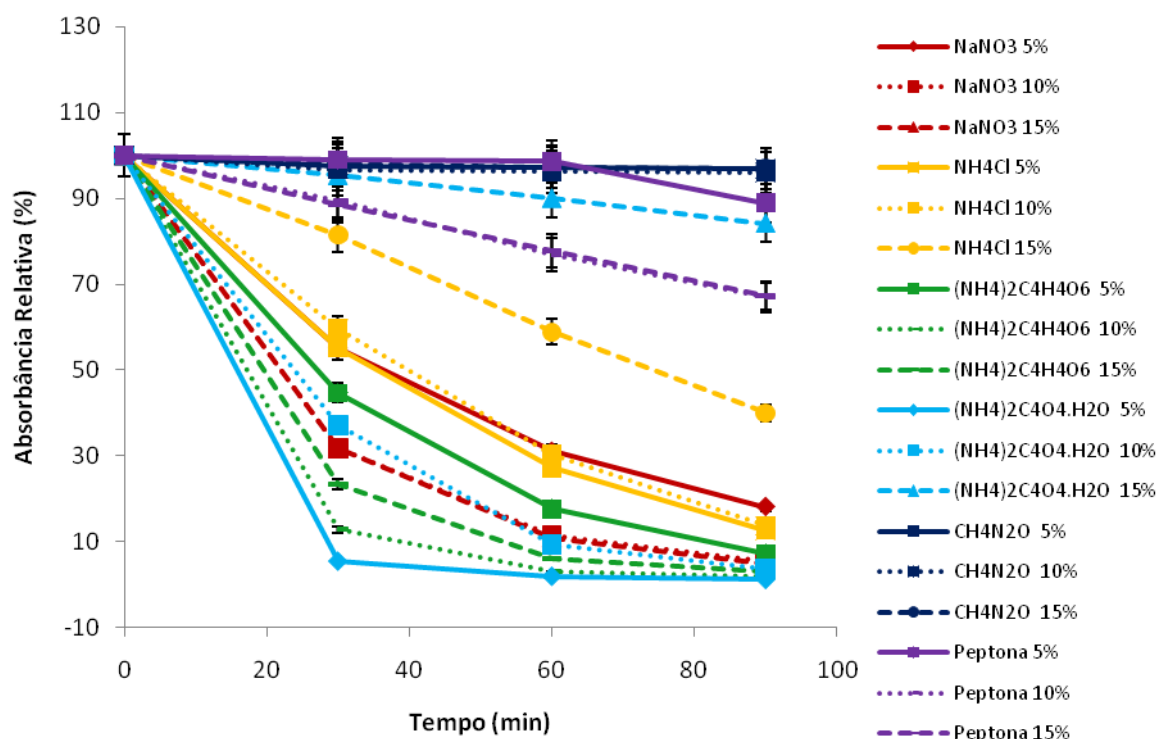


GRÁFICO 16 - ATIVIDADE DESCORANTE DOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES MEIOS DE NITROGÊNIO OBTIDOS EM INCUBAÇÃO COM 002 USANDO AMIDO 5g/L COMO FONTE DE CARBONO. A absorbância foi medida a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MML contendo 0,1g/L de corante remazol azul.
FONTE: O autor (2009)

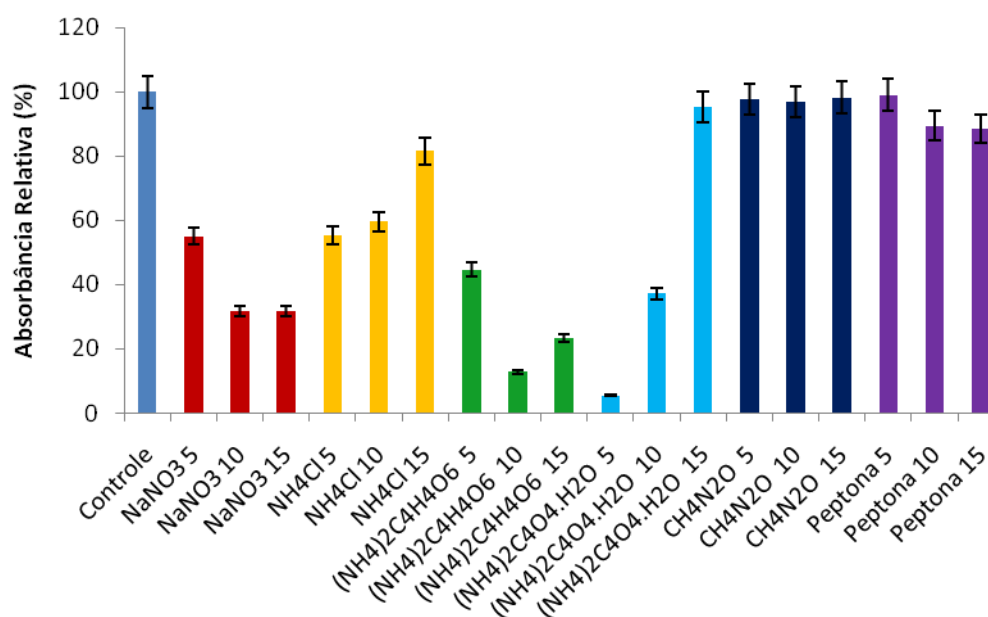


GRÁFICO 17 - HISTOGRAMA COMPARATIVO DAS ABSORVÂNCIAS MEDIDAS NO TEMPO 30 MINUTOS PARA CADA FONTE DE NITROGÊNIO. Gráfico para 002 em amido 5g/L. FONTE: O autor (2009).

Tal como foi realizado em 002 para o experimento de fontes de carbono, neste também foi aferido os pesos secos das amostras (Gráfico 18). Tal como para o experimento anterior, visualmente os micélios dos meios mais concentrados e dos meios com peptona eram maiores, entretanto mais uma vez os pesos obtidos não confirmam essa observação.

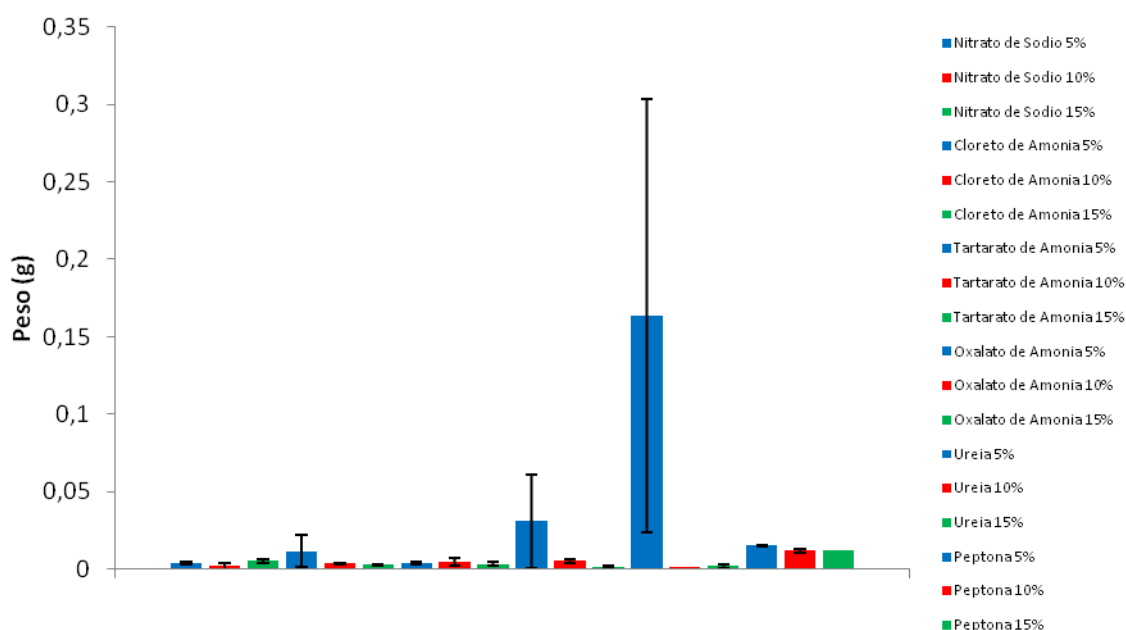


GRÁFICO 18 - PESOS SECOS DOS MICÉLIOS LAVADOS, OBTIDOS A PARTIR DO EXPERIMENTO DE FONTES DE NITROGÊNIO PARA 002 COM AMIDO EM MML. FONTE: O Autor (2009)

Em seguida, foi analisado o experimento com 002 usando maltose 5g/L como fonte de carbono. O mesmo comportamento de descoloração visual rápida foi observado, mais uma vez os meios contendo uréia e peptona não apresentaram perda da cor, mesmo após os 15 dias. A absorbância mostrou descoloração quase total em todos os meios exceto naqueles com uréia e peptona, sendo que na uréia houve um curioso aumento na absorbância dos meios com fungo, em comparação com seus respectivos controles (Gráfico 19). A atividade descorante mostrou que os sobrenadantes dos meios contendo oxalato de amônia 5g/L e nitrato de sódio 5g/L tiveram as descolorações mais rápidas (Gráfico 20 e 21).

Todos os meios contendo peptona 15g/L sofreram descoloração espontânea logo após a autoclavagem e portanto não foram analisados. Essa descoloração entretanto é apenas visual, uma vez que a absorbância dessas soluções não diminui. A perda da cor azul se dá por um processo de floculação entre o corante e a peptona após a autoclavagem, mas não implica em degradação real do corante.

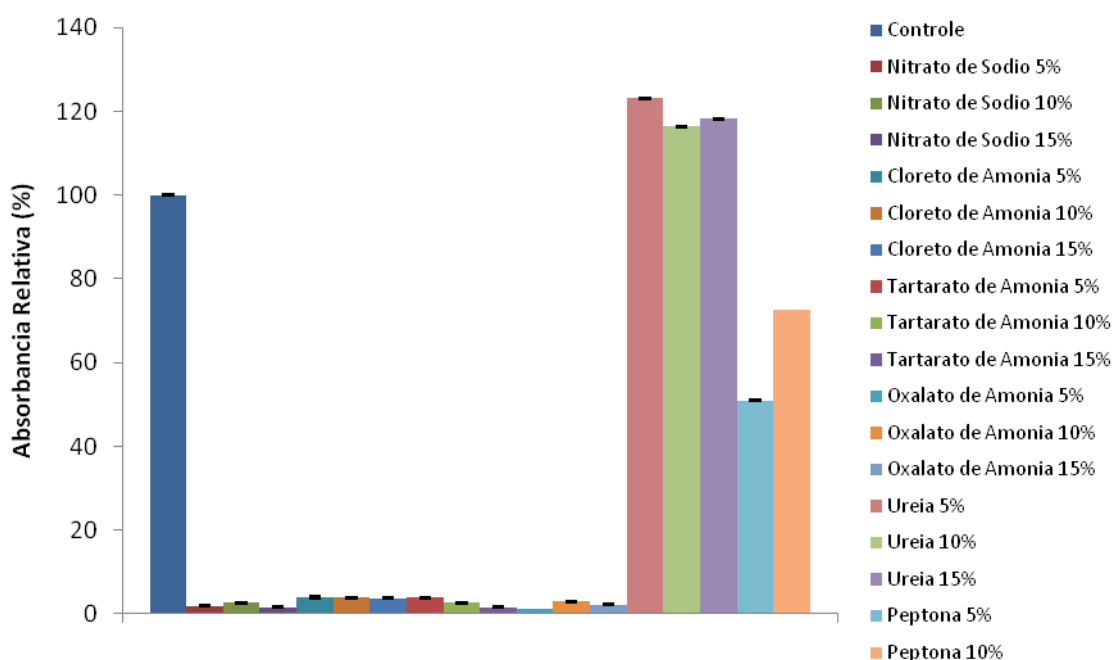


GRÁFICO 19 - ABSORBÂNCIA RELATIVA DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO PARA 002 USANDO MALTOSE 5g/L COMO FONTE DE CARBONO. Absorbâncias medidas a 600nm após 15 dias de incubação em solução com 0,1g/L de corante remazol azul em MML.
FONTE: O autor (2009)

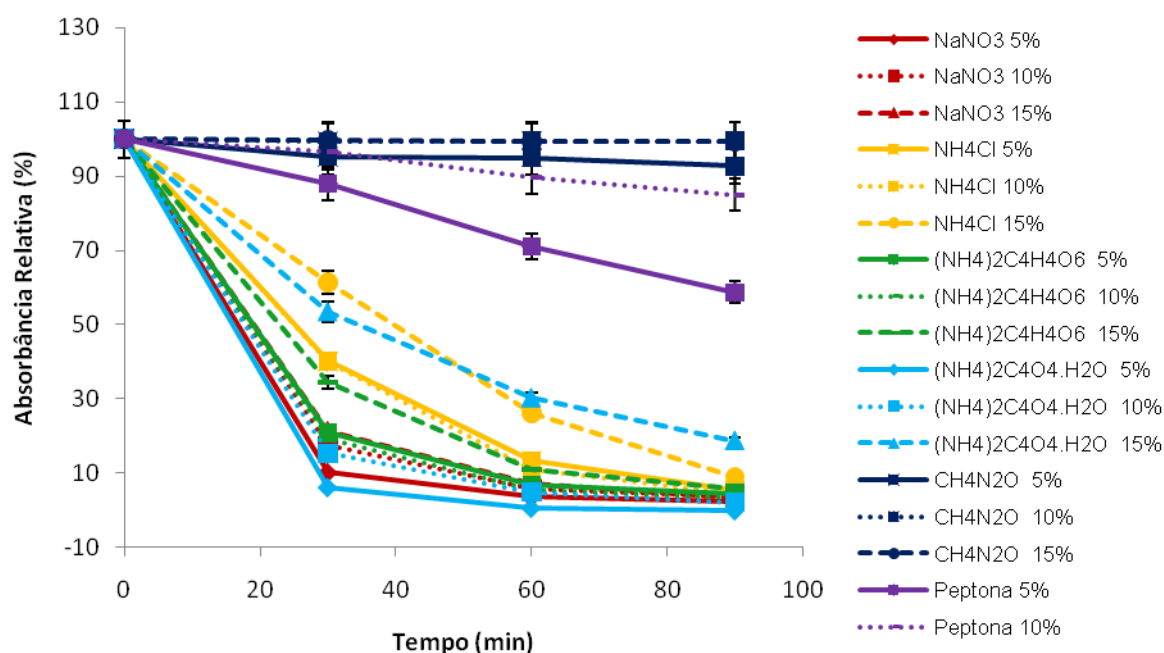


GRÁFICO 20 - ATIVIDADE DESCORANTE DOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES MEIOS DE NITROGÊNIO OBTIDOS EM INCUBAÇÃO COM 002 USANDO MALTOSE 5g/L COMO FONTE DE CARBONO. A absorbância foi medida a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MML contendo 0,1g/L de corante remazol azul.
FONTE: O autor (2009)

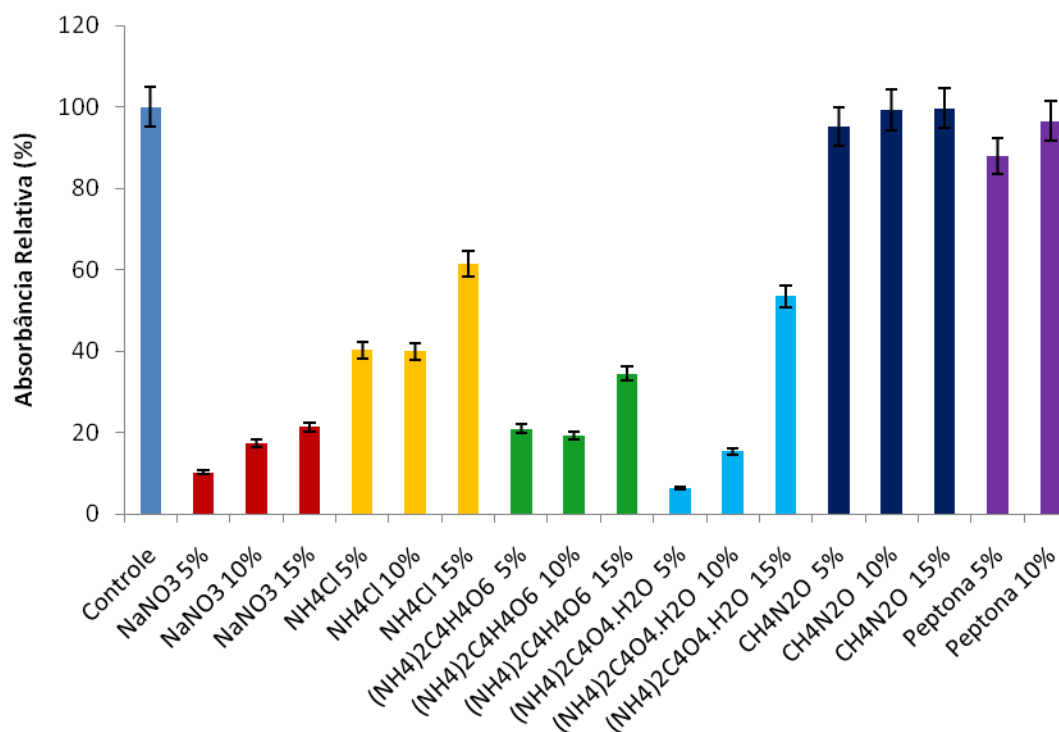


GRÁFICO 21 - HISTOGRAMA COMPARATIVO DAS ABSORBÂNCIAS MEDIDAS NO TEMPO 30 MINUTOS PARA CADA FONTE DE NITROGÊNIO. Gráfico para 002 em maltose 5g/L.
FONTE: O autor (2009).

Os pesos secos dessas amostras também foram aferidos (Gráfico 22) porém os dados obtidos são contraditórios quando comparados as observações visuais.

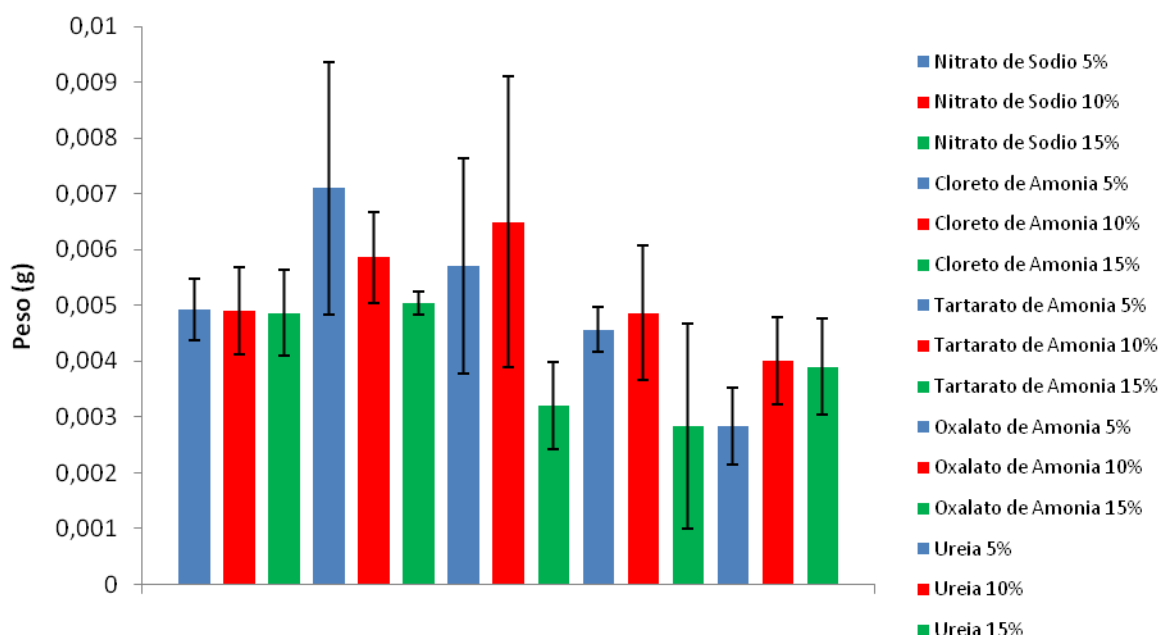


GRÁFICO 22 - PESOS SECOS DOS MICÉLIOS LAVADOS, OBTIDOS A PARTIR DO EXPERIMENTO DE FONTES DE NITROGÊNIO PARA 002 COM MALTOSE EM MML.
FONTE: O Autor (2009)

Em seguida o mesmo desenho experimental foi aplicado para *H. biennis*, para ele foram igualmente testadas às duas fontes de carbono que apresentaram o melhor desempenho nos testes de fontes de carbono, a sacarose e o glicerol ambos a 10g/L, para os mesmo seis tipos de fontes de nitrogênio, cada um nas três concentrações usuais de 5, 10 e 15g/L, todas usando MMS.

O primeiro resultado obtido foi nas fontes de nitrogênio testadas em maltose. Tal como foi observado para a cepa 002, os meios apresentaram descoloração total visual em três dias, exceção feita para os meios contendo oxalato de amônia, uréia e peptona. A análise da absorbância dos eluídos mostrou degradação quase total do corante nos meios que apresentaram degradação visual total (Gráfico 23). Entretanto a análise da atividade descorante mostrou uma eficiência menor, quando comparada a eficiência de degradação dos testes realizados para as fontes de carbono e mesmo para a triagem (Gráfico 24 e 25).

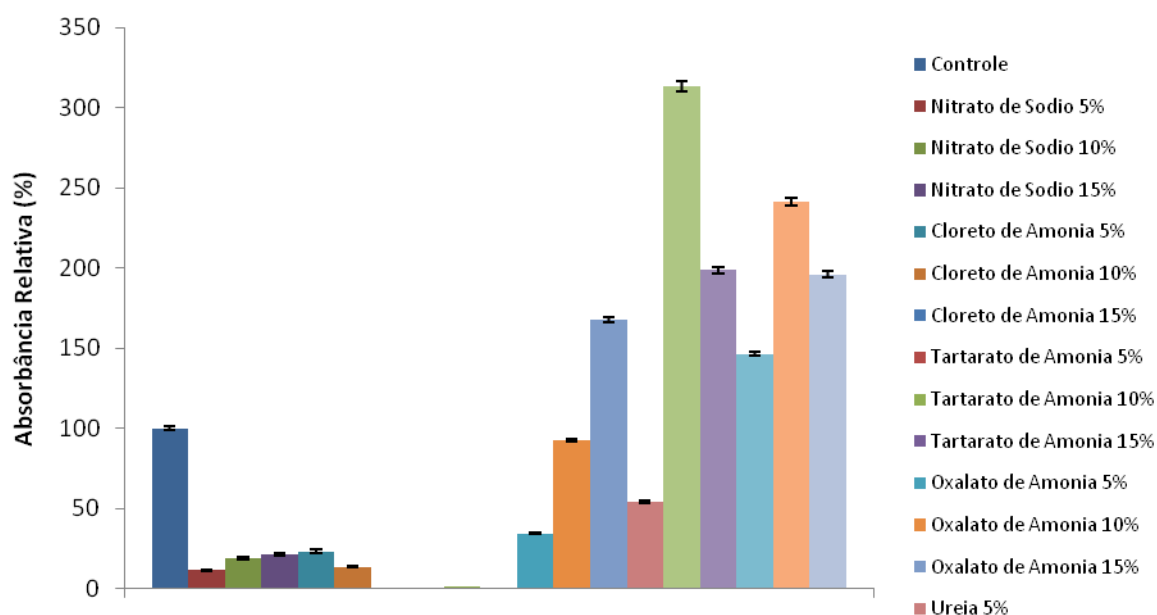


GRÁFICO 23 - ABSORBÂNCIA RELATIVA DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO PARA *H. biennis* USANDO MALTOSE 10g/L COMO FONTE DE CARBONO. Absorbâncias medidas a 600nm após 15 dias de incubação em solução com 0,1g/L de corante remazol azul em MMS. FONTE: O autor (2009)

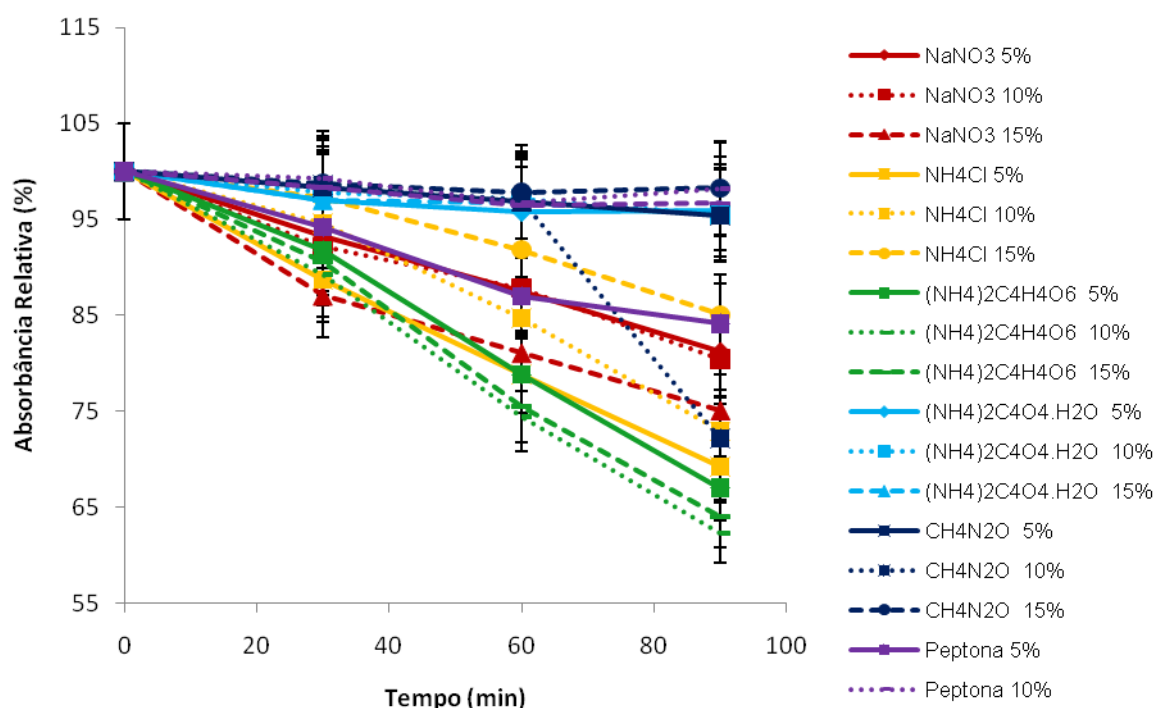


GRÁFICO 24 - ATIVIDADE DESCORANTE DOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES MEIOS DE NITROGÊNIO OBTIDOS EM INCUBAÇÃO COM *H. biennis* USANDO SACAROSE 10g/L COMO FONTE DE CARBONO. A absorbância foi medida a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MMS contendo 0,1g/L de corante remazol azul. FONTE: O autor (2009).

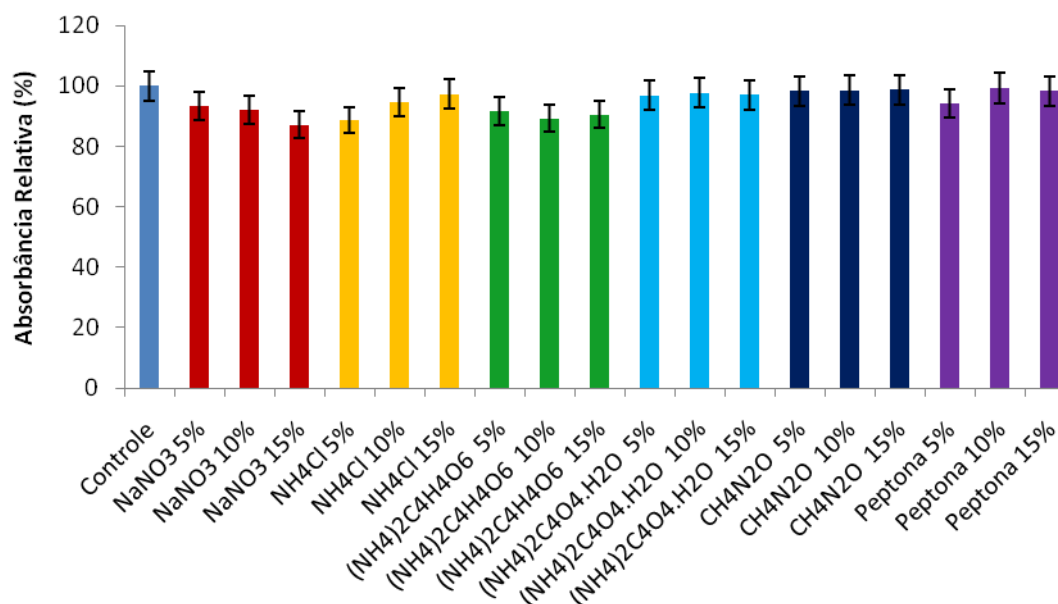


GRÁFICO 25 - HISTOGRAMA COMPARATIVO DAS ABSORVÂNCIAS MEDIDAS NO TEMPO 30 MINUTOS PARA CADA FONTE DE NITROGÊNIO. Gráfico para *H. biennis* em sacarose 10g/L. FONTE: O autor (2009).

Os resultados obtidos nos cultivos com glicerol tiveram um comportamento similar, devendo-se ressaltar que nestes a peptona e a uréia a 5g/L apresentaram descoloração. A análise da absorvância dos eluídos indica degradação quase total do corante (Gráfico 26). Porém os resultados obtidos na atividade descorante também não foram tão eficientes quanto aqueles obtidos em experimentos anteriores (Gráfico 27 e 28).

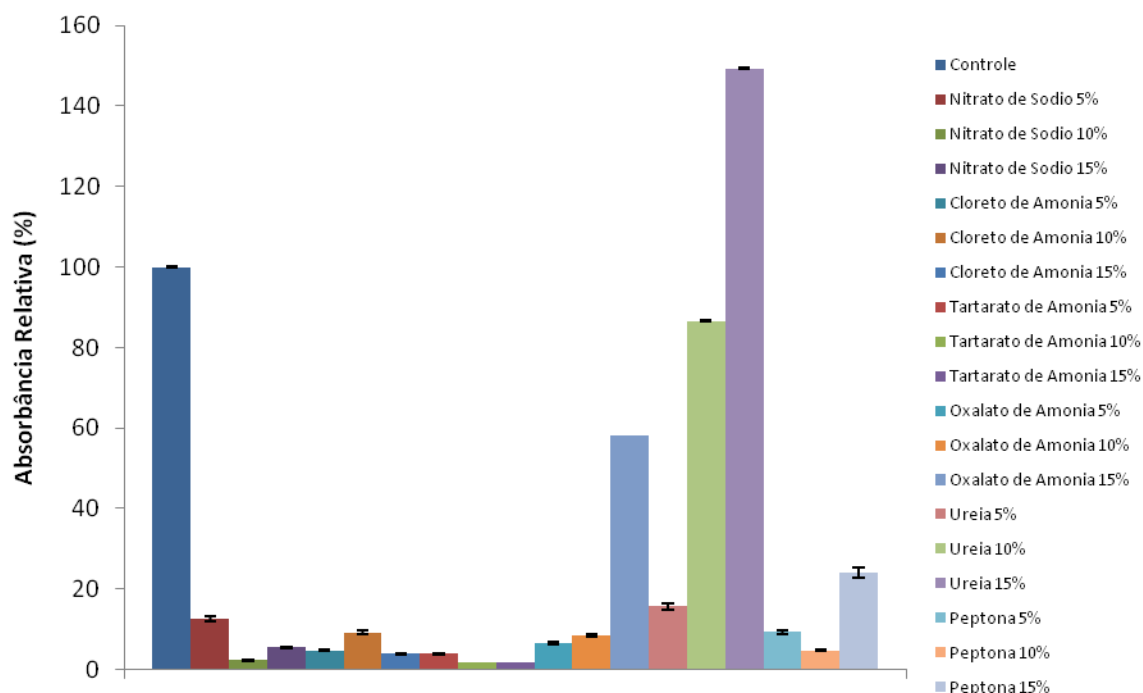


GRÁFICO 26 - ABSORBÂNCIA RELATIVA DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO PARA *H. biennis* USANDO GLICEROL 10g/L COMO FONTE DE CARBONO. Absorbâncias medidas a 600nm após 15 dias de incubação em solução com 0,1g/L de corante remazol azul em MMS. FONTE: O autor (2009)

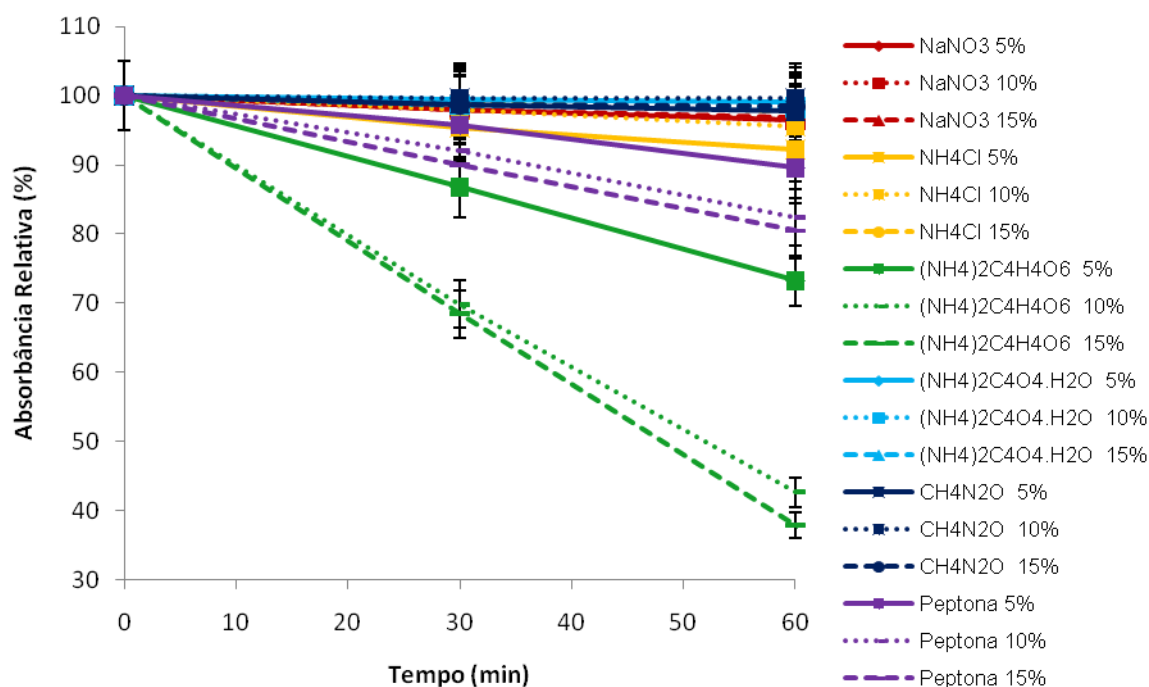


GRÁFICO 27 - ATIVIDADE DESCORANTE DOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES MEIOS DE NITROGÊNIO OBTIDOS EM INCUBAÇÃO COM *H. biennis* USANDO GLICEROL 10g/L COMO FONTE DE CARBONO. A absorbância foi medida a 600nm após 15 dias de incubação em solução de MMS contendo 0,1g/L de corante remazol azul. FONTE: O autor (2009)

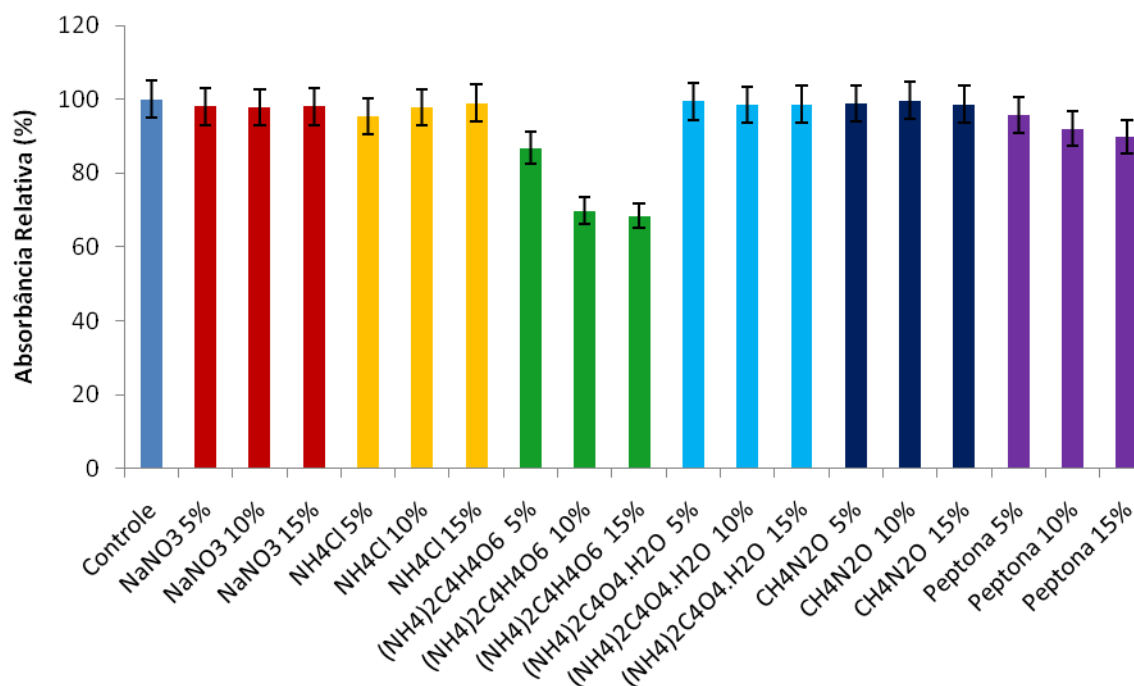


GRÁFICO 28 - HISTOGRAMA COMPARATIVO DAS ABSORBÂNCIAS MEDIDAS NO TEMPO 30 MINUTOS PARA CADA FONTE DE NITROGÊNIO. Gráfico para *H. biennis* em glicerol 10g/L. FONTE: O autor (2009).

Os ensaios de eletroforese foram executados conforme descrito na metodologia, entretanto não foi possível observar bandas na coloração de prata, talvez devido à baixíssima concentração das proteínas nas amostras, concentração tão baixa que sequer foi detectada no ensaio de bradford, apesar de todas as amostras mostrarem atividade descorante, a qual foi retestada logo antes da aplicação no gel. O zimograma também não mostrou resultados satisfatórios provavelmente por não ter sido possível renaturar as enzimas, portanto novas soluções de renaturação precisam ser testadas.

A investigação da presença e caracterização de enzimas lignolíticas apontou a presença de manganês peroxidase (Gráfico 29 e 30) em todas as amostras testadas e ausência de lacases ou lignina peroxidases. Foi testado o sobrenadante obtido com 002 no experimento de fontes de nitrogênio, cultivado em tartarato de amônia a 10g/L e o eluído obtido com *H.biennis* no experimento de fontes de carbono, cultivado em glicerol a 10g/L.

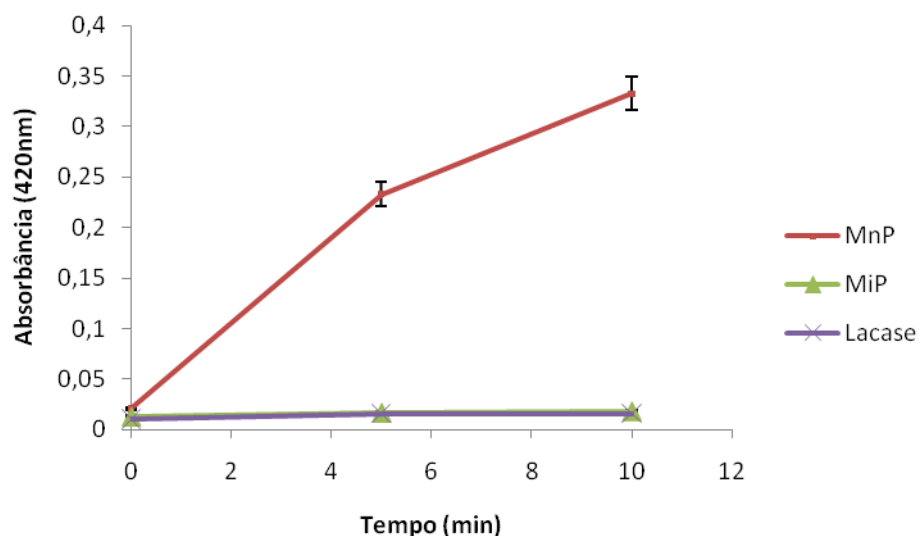


GRÁFICO 29 - CURVA DE OXIDAÇÃO DO ABTS OBTIDA NO TESTE COM SOBRENADANTE DE 002 CULTIVADO EM MML COM TARTARATO DE AMÔNIA A 10g/L. A absorbância medida em 420nm a cada 5min durante 10min
 FONTE: O autor (2009)

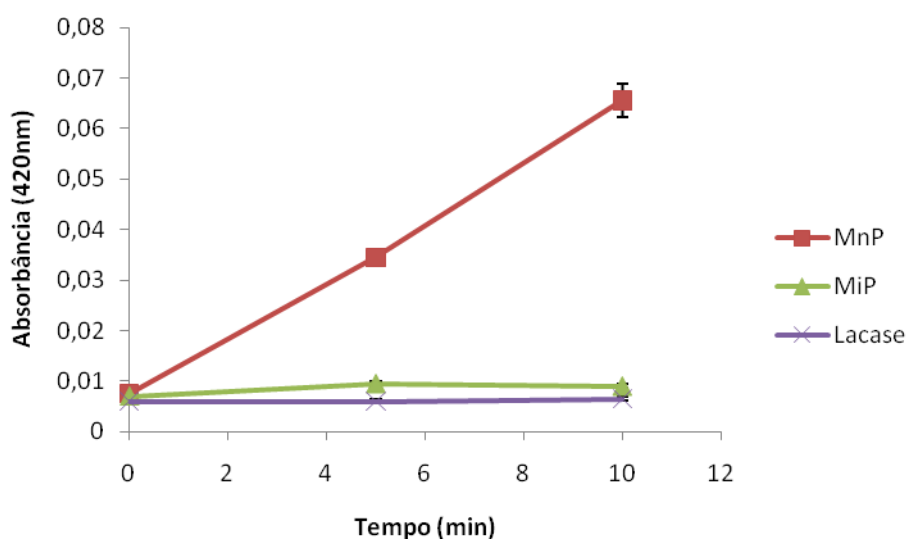


GRÁFICO 30 - CURVA DE OXIDAÇÃO DO ABTS OBTIDA NO TESTE COM ELUÍDO DE *H. biennis* CULTIVADO EM MMS COM GLICÉROL A 10g/L. A absorbância medida em 420nm a cada 5min durante 10min
 FONTE: O autor (2009)

O teste usando Remazol Azul no lugar do ABTS mostrou atividade somente nos meios em que todas as enzimas podiam agir e no meio MnP (Gráfico 31 e 32).

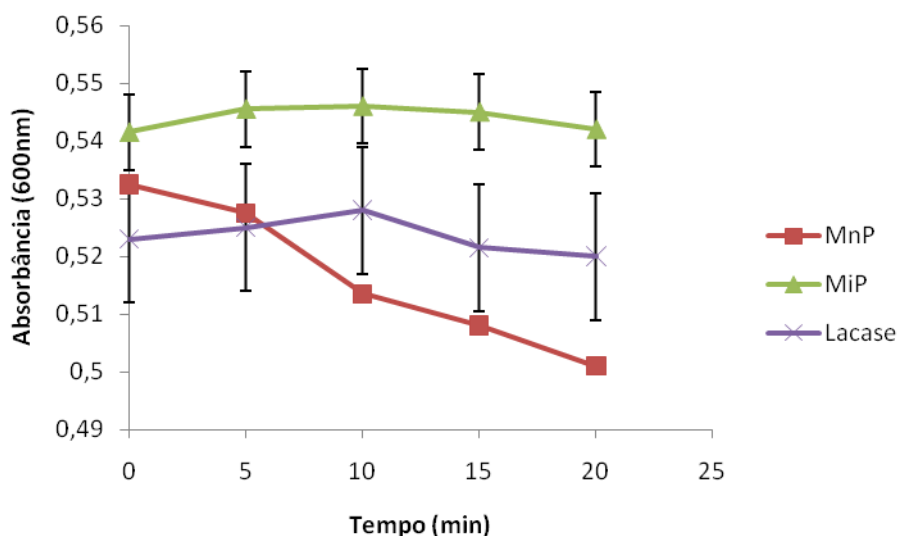


GRÁFICO 31 - CURVA DE DEGRADAÇÃO DO REMAZOL AZUL OBTIDA USANDO ELUÍDO DE *H. biennis* CULTIVADO EM MMS COM SÁCAROSE 5g/L> A absorbância foi medida a 600nm a cada 5min.

FONTE: O autor (2009)

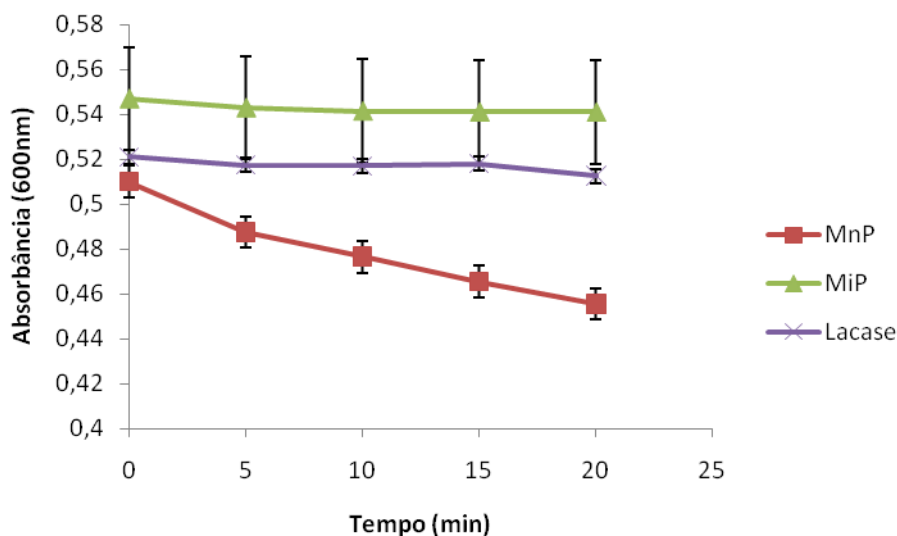


GRÁFICO 32 - CURVA DE DEGRADAÇÃO DO REMAZOL AZUL OBTIDA USANDO SOBRENADANTE DE 002 CULTIVADO EM MML COM MALTOSE A 5g/L E OXALATO DE AMÔNIA A 5g/L. Absorbância medida a 600nm a cada 5min.

FONTE: O autor (2009)

O mesmo padrão de resultados foi obtido usando guaiacol 0,05mM no lugar do ABTS (gráfico 33 e 34).

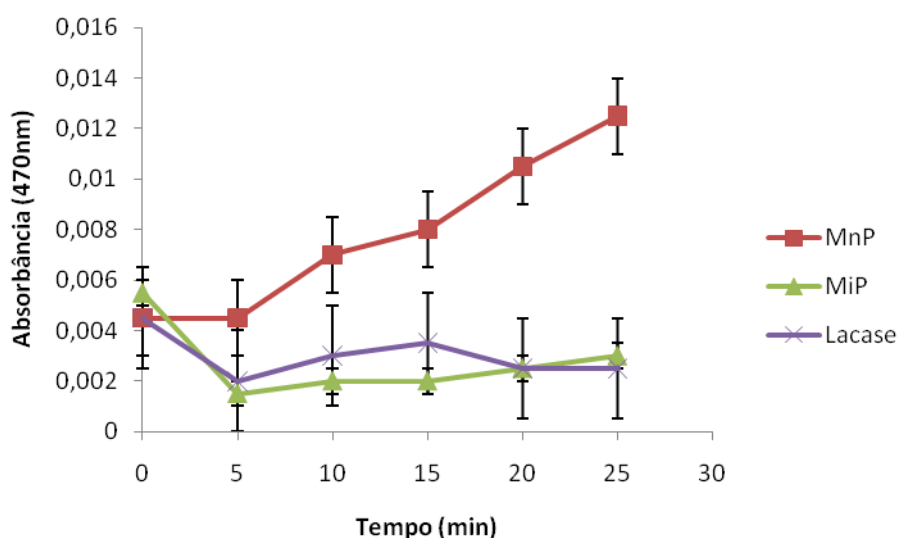


GRÁFICO 33 - CURVA DE OXIDAÇÃO DO GUAICOL OBTIDA USANDO ELUÍDO DE *H. biennis* CULTIVADO EM SACAROSE A 5g/L. Absorbância medida a 470nm a cada 5min.
 FONTE: O autor (2009)

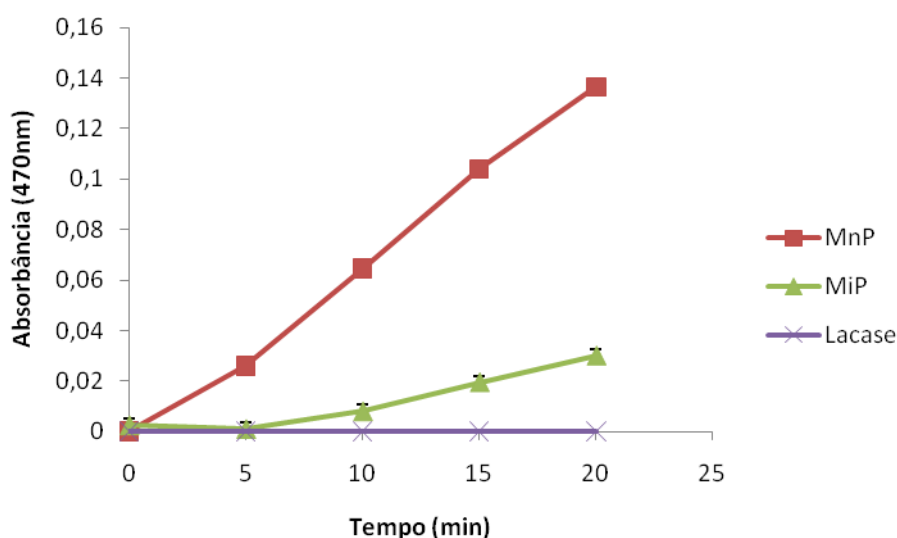


GRÁFICO 34 - CURVA DE OXIDAÇÃO DO GUAICOL OBTIDA USANDO SOBRENADANTE DE 002 CULTIVADO EM MALTOSE 5g/L E OXALATO DE AMÔNIA A 5g/L. Absorbância medida a 470nm a cada 5min.
 FONTE: O autor (2009)

A observação do perfil de absorção de luz UV-Vis da solução aquosa de corante Remazol Azul 0,1g/L mostrou que os maiores picos de absorbância estão a 280nm e 600nm (Gráfico 35). A mesma análise feita para os sobrenadantes de quatro amostras obtidas do cultivo dos fungos mostrou que a pico a 600nm havia sido completamente degradado enquanto que o pico a 280nm não somente permaneceu como se tornou muito mais proeminente (Gráfico 36).

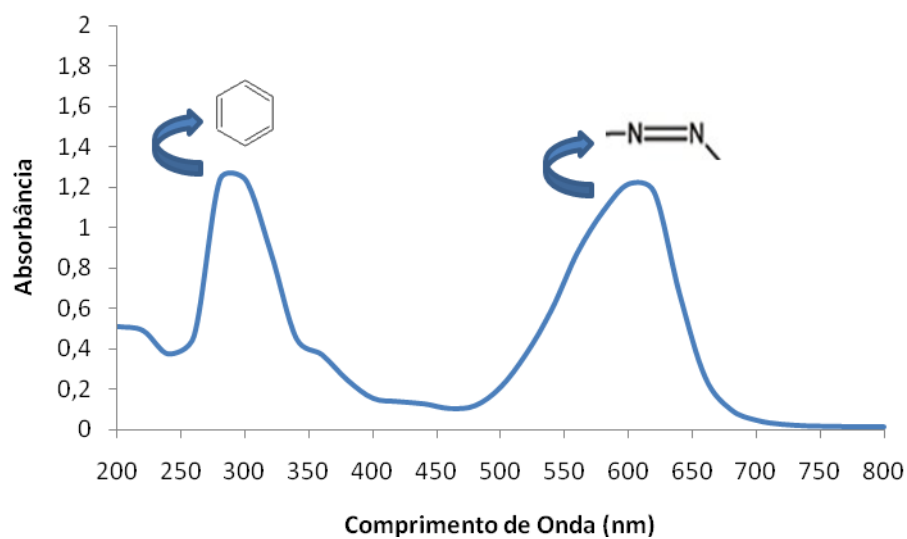


GRÁFICO 35 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE UMA SOLUÇÃO AQUOSA DO CORANTE REMAZOL AZUL 0,1g/L, ENTRE 200 E 800nm. As setas indicam a estrutura química que correspondente aquele tipos de absorbância naquele comprimento de onda.
FONTE: O autor (2009)

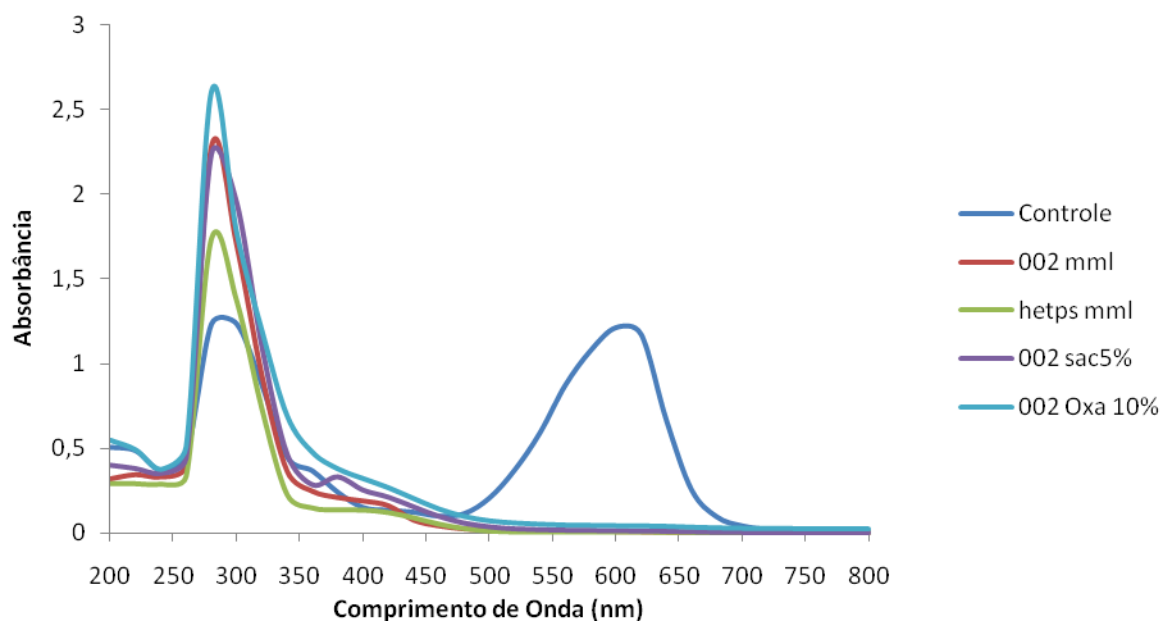


GRÁFICO 36 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE QUATRO SOBRENADANTES OBTIDOS DO CULTIVO DOS FUNGOS EM MML, ENTRE 200 E 800nm.
FONTE: O autor (2009).

5. DISCUSSÃO

Os experimentos de triagem revelaram que as cepas *H. biennis* e 002 apresentam atividade degratativa sobre o corante, e que esta atividade se manifesta em diferentes intensidades e padrões de secreção de acordo com a variação do meio de cultura (Gráfico 3), este tipo de efeito tem sido relatado na literatura para outros fungos (WESENBERG *et al.*, 2003).

Isto está em parte relacionado com as condições de cultivo desses fungos, pois a literatura também relata que a produção das LMEs ocorre durante o metabolismo secundário e é induzida por níveis limitados de nutrientes, particularmente o nitrogênio (BUSWELL e ODIER, 1987; BOOMINATHAN e REDDY, 1992; WARIISHI *et al.*, 1992; REDDY e D'SOUZA, 1994; HATTAKA, 1994; THURSTON, 1994; LEONOWICZ *et al.*, 1999). Por isso, era esperado que a mudança na composição do meio de cultivo tanto qualitativamente quanto quantitativamente apresentasse diferentes respostas quanto ao nível de atividade descorante.

A cepa 003 revelou um grande potencial de bioadsorção (HU, 1992,1996; TSEZOS e BELL, 1989; KUMAR *et al.*, 1998). A literatura relata que este processo é efetivo quando as condições para o crescimento e manutenção da população microbiana não são favoráveis (MODAK e NATARAJAN, 1995), portanto é provável que a presença do corante esteja relacionado à atividade bioadsorvente do fungo em todas as condições. A adsorção pela biomassa ocorre através de uma série de mecanismos complexos como adsorção superficial, troca de íons, complexação, complexação-quelação e microprecipitação, porém as informações disponíveis sobre elas são limitadas e requerem mais estudos (BANKS e PARKINSON, 1992; CHU e CHEN, 2002a,b).

Os experimentos para a tentativa de descoloração do Remazol Vermelho e Amarelo não obtiveram resultados. Como foi citado anteriormente as três enzimas LMEs tem as suas sínteses afetadas por diferentes condições de cultivo (BUSWELL *et al.* 1984; RUIZ-DUENAS *et al.*1999; COLLINS e DOBSON 1997; PALMIERI *et*

al.2000). Porém nenhuma das condições tentadas pareceu apontar um caminho promissor, sendo que em alguns casos foi observado aumento da absorbância, talvez devido à atividade polimerizante de lacase (YOUNG *et al.*, 1995; RIVA, 2006), ou a secreção de aromáticos, característica comum em muitos fungos (WESENBERG *et al.*, 2003). Apesar de os resultados mostrados no Gráfico 7 mostrarem uma provável atividade descorante para remazol vermelho, que entretanto, não conseguiu ser comprovada. É provável que devido às diferenças estruturais entre os corantes, as enzimas lignolíticas das cepas usadas não possam atuar com eficiência sobre eles.

Explorando o fato de diferentes composições do meio levarem a diferenças na expressão enzimática, foram montados outros dois experimentos nos quais se variou a fonte de carbono e depois de nitrogênio, ambos resultando em diferenças expressivas na velocidade de descoloração do substrato.

No primeiro experimento, variando as fontes de carbono, e as concentrações de cada uma, notou-se que em todos os casos, a absorbância das soluções foi eliminada no λ de 600nm para ambas as cepas, porém cada composição o fez em velocidades diferentes. Para 002 se pode notar uma tendência dos meios menos concentrados em fontes de carbono apresentar as atividades descorantes mais rápidas.

Dentre os exemplos de fontes de carbono que seguiram claramente este padrão estão maltose, amido, glucose e glicerol. Um resultado semelhante foi relatado por Asgher *et al.*, (2008), neste trabalho, usando as cepas *Schizophyllum commune* e *Ganoderma lucidum*. Os autores relataram um aumento fortíssimo na atividade descorante usando glucose 1% (m/v), levando a uma descoloração total do corante Solar Golden Yellow R em 48h, no meio padrão anterior a descoloração máxima era de 70% em 7 dias.

As outras fontes usadas foram frutose, maltose, sacarose, amido e melaço, nas concentrações de 1%, todas elas também intensificaram a capacidade descorante, porém não com a mesma eficiência da glucose. Em seguida eles optaram por variar a concentração da glucose de 0,5% a 2%, obtendo a concentração de 1% como a mais apropriada para o processo descolorativo. O trabalho de Yamanaka *et al.* (2008) com *Trametes vilosa* corrobora o efeito do

aumento na concentração de glucose com a queda na atividade descorante, chegando a inibir a atividade da lacase e da MnP em 90% e 50% respectivamente.

Segundo Kapdan e Kapdan (2002) os WRFs mostram maior crescimento quando as fontes de energia estão prontamente disponíveis e produzem enzimas do metabolismo secundário, como as LMEs, quando estas são mais escassas. Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os encontrados na literatura, Kapdan e Kapdan (2002) por exemplo, uma descoloração ótima de 77% usando glucose 0,5% para a cepa por eles estudada, o aumento para 2% reduziu o nível de descoloração para 65%.

Porem, a análise dos pesos secos não revelou nenhuma relação entre o tamanho do micélio e a velocidade descorante, em grande parte devido aos resultados variados e aos altos desvios padrão, levando a necessidade de uma análise de dosagem de proteínas para melhores esclarecimentos. Apesar disso, pode-se notar claramente que em alguns meios houve crescimento particularmente grande dos micélios, como glucose 5g/L, maltose 5g/L e amido 15g/L.

O experimento de fontes de carbono para *H. biennis* mostrou comportamento um tanto diferente, no qual as fontes com concentração a 10g/L se mostraram em muitos casos, melhores que as de 5g/L e 15g/L, observou-se inclusive uma “inversão” no padrão para maltose, na qual 15g/L foi mais eficiente do que 10g/L e este foi melhor do que 5g/L. A descoloração foi quase total ao final dos 15 dias.

Escolhidas as duas fontes de carbono mais adequadas para cada fungo, testou-se a variação na fonte de nitrogênio. No experimento com 002 usando amido 5g/L, os meios menos concentrados foram os melhores no caso de cloreto de amônia e oxalato, para os outros a concentração de 10g/L foi a mais adequada, para uréia não houve descoloração total mesmo após os 15 dias, enquanto que para peptona, quanto maior a concentração, melhor a atividade a atividade, apesar de esse resultado ser contraditório com o que foi observado na medição de absorbâncias dos meios. Asgher *et al.* (2008) relata que fontes adicionais de nitrogênio inibiram o crescimento e a atividade descorante de suas cepas. Deve-se mencionar que nos meios com uréia e peptona houve crescimento exacerbado dos micélios, apesar de estas observações visuais não serem totalmente apoiadas pela aferição dos pesos secos.

O experimento de 002 usando maltose 5g/L confirmou o oxalato 5g/L como a melhor fonte de nitrogênio para se obter atividade descorante rápida. Tal como no anterior os meios menos concentrados foram melhores que os mais concentrados. Neste experimento os meios contendo uréia também não apresentaram atividade descorante consistente, apresentando inclusive, nas medições de absorbância após 15 dias, absorbância maior que as do controle, efeitos como este podem talvez ser atribuídos a atividade de polimerização das lacases (YOUNG *et al.*, 1995; RIVA, 2006). Mais uma vez os pesos secos não apontaram nenhum padrão ou relação com a atividade descorante.

O primeiro experimento de fontes de nitrogênio com *H. biennis* usou sacarose 10g/L como fonte ótima de carbono. A análise da absorbância mostrou aumento dela, em relação aos controles, nos meios com uréia, peptona e oxalato. Existe a possibilidade de ação polimerizante da lacase (YOUNG *et al.*, 1995; RIVA, 2006), entretanto como não foi detectada atividade desta enzima nos ensaios de oxidação, ela precisaria estar ligada a parede celular. Guanamani *et al.*(2006) relata que a produção de lacase aumenta quando o WRF *P. chrysosporium* é cultivado em meio sólido fermentativo, pois este de certa forma simularia certas condições naturais de crescimento do fungo como redução da pressão parcial de oxigênio, redução da umidade e redução da concentração de nitrogênio.

Levando em conta que os efeitos de aumento de absorbância neste trabalho, foram observados principalmente nos cultivos em meio sólido, uma ou mais dessas condições podem estar atuando, levando a um aumento na produção de lacase, esta pode ser uma explicação para estes resultados, particularmente aqueles obtidos com uso de uréia. Arora e Gill (2001) também relatam que meios ricos em aminoácidos aromáticos como triptofano e tirosina podem induzir a formação de um metabolito derivado do triptofano (3-hidroxy-2-aminobenzoato) que age como mediador nas reações catalisadas por lacase para o WRF *Pycnoporus cinnabarinus*.

Se este for o caso dos meios ricos em peptona, o aumento da absorbância dos meios após 15 dias de cultivo seria causado pelo estímulo a produção de lacases devido ao cultivo em MMS e a potencialização da atividade polimerizante das mesmas, pela presença destes tipos de aminoácidos. Porém, fica difícil entender a presença de atividade descorante razoável no ultimo ensaio de 90min, de

H. biennis para fontes de nitrogênio. A identificação da composição de aminoácidos nos meios de peptona e o teste de oxidação total de ABTS nos meios onde houve aumento da absorbância podem esclarecer melhor estes resultados.

O segundo experimento de fontes de nitrogênio usou glicerol 10g/L como fonte ótima de carbono. O resultado das absorbâncias mostrou aumento apenas em uréia 15g/L. Para as atividades descorantes, o padrão de aumento de atividade com queda na concentração de nutriente usado foi seguido parcialmente. A melhor fonte foi tartarato 15g/L. Tanto no experimento anterior quanto neste, os resultados obtidos variando as fontes de nitrogênio foram inferiores aos obtidos variando as fontes de carbono e mesmo aqueles obtidos na triagem.

A varredura em UV/Vis mostrou que de fato há quebra das ligações azo nos meios com corante nos quais os fungos cresceram, porém há a formação de compostos aromáticos, caracterizada pelo aumento expressivo no pico de 280nm. Isto pode ser um resultado negativo pois embora a solução esteja sendo descolorida ela não está sendo totalmente degradada.

Os testes de oxidação de ABTS e outros substratos mostram claramente que a principal enzima atuante é uma MnP, enzima que, conforme foi citado por Wesenberg (2003) é o tipo enzimático mais comum entre os WRFs. Nos meios testados não foi detectada atividade expressiva de lacase, porém estes meios são aqueles onde não houve o aumento da absorbância do eluído, portanto não está descartada a hipótese de atividade polimerizante de lacase para estes casos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que das três cepas de fungos analisadas, as cepas 002 e *H. biennis* possuem atividade biodegradativa do corante têxtil Remazol Azul, mas não do Remazol Vermelho ou do Amarelo, enquanto que a cepa 003 embora carente de atividade de biodegradação manifestou uma alta capacidade de bio sorção para os três corantes testados.

O cultivo dos fungos em meio sólido e meio líquido produziu diferenças na atividade descorante dos fungos, principalmente para a cepa 002.

O tipo de fonte de carbono e de nitrogênio assim como a concentração destas no meio de cultura alterou drasticamente a produção de atividade descorante

A atividade descorante, para a cepa 002, é causada pelo sobrenadante dos cultivos e não pelos micélios, indicando que as enzimas responsáveis pela mesma são secretadas. Acredita-se que o mesmo ocorre em *H. biennis* uma vez que o eluído dos cultivos deste fungo também apresenta grande atividade descorante, embora, devido ao fato de este último ter sido cultivado em MMS, a avaliação de atividade descorante pelos micélios não tenha sido realizada.

Os testes de oxidação usando substratos aromáticos sugerem que as enzimas envolvidas são da classe das peroxidases dependentes de manganês.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA,M.R.; DALTIM,D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v.19, n.3, p.320-330, 1996.

ARORA,D.S.; GILL,P.K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v.77, p.89-91, 2001.

ASGHER,M.; KAUSAR,S.; BHATTI,H.N.; SHAH,S.A.H.; ALI,M. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. **Biodeterioration & Biodegradation**, v.61, p.189-193, 2008.

BAIOCCO,P.; BARRECA,A.M.; FABBRINI,M.; GALLI,C.; GENTLI,P. Promoting laccase activity towards non phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.1, p.191-197, 2003.

BANAT,I.M; NIGAM,P.; SINGH,D.; MARCHANT,R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Biosource Technology**, v.58, p.217-227, 1996.

BANKS, C.J. e PARKINSON, M.E. The mechanism and application of fungal biosorption to color removal from raw waters. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v.54, p. 192–196, 1992.

BAUGHMAN,G.L.; PERENICH,T.A. Fate of dyes in aquatic systems: Solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. **Environ. Toxicol. Chem.** V.7, p.183-199, 1988.

BETTUCCI,L.; LUPO,S. ; SILVA,S. Control growth of wood-rotting fungi by non-volatile metabolites from *Trichoderma spp.* and *Gliocladium virens*. **Cryptogamie. Mycologie**, v.9, n.2, p.157-165, 1988.

BOOMINATHAN, K.R, REDDY ,C.A . Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. In: **Akora, DK, Elander, RP, Mukerji, KG (eds) Handbook of applied mycology**, v 4.Dekker, New York, p 763–782, 1992.

BUSWELL ,J.A., MOLLET, B., ODIER, E. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nutrient sufficiency. **FEMS Microbiol Lett** , v.25, p.295–299, 1984.

BUSWELL, J.A., ODIER,E., Lignin biodegradation. **Crit Rev Biotechnol**, v.6, p.1–60, 1987

CAMERON,M.D.; TOMIFEEVSKI,S.; AUST,D.S. Enzimillogy of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradetion of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.751-758, 2000.

CHU, H.C., CHEN, K.M. Reuse of activated sludge biomass: I. Removal of basic dyes from wastewater by biomass. **Process Biochem**, v.37, p. 595–600, 2002a.

CHU, H.C., CHEN, K.M. Reuse of activated sludge biomass: II. The rate processes for the adsorption of basic dyes on biomass. **Process Biochem**, v.37, p.1129–1134, 2002b.

COLLINS, P.J., DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl Environ Microbiol**, v.63, p.3444–3450, 1997.

EATON,R.A, HALE,M.D.C. Wood, decay, pests and prevention. **Chapman and Hall**, London, 1993.

EGGERT,C.; TEMP,U.; ERIKSSON,K.E.L. The ligninoltic system of the White-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinnus*: purification and characteriation of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1151-1158, 1996.

GLENN,J.K.; GOLD,M.H. Decolourization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.6, p.1741-1747, 1983.

GUANAMANI,A.; JAYAPRAKASHVEL,M.; ARULMANI,M.; SADULLA,S. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.1017-1021, 2006.

GUARATINI,C.C.I.; ZANONI,M.V.B. Corantes têxteis. **Quimica Nova**, v.23, n.1, p.71-78, 2000.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol Rev** , v.13, p.125–135, 1994.

HEINFLING,A.; MARTINEZ,M.J.; MARTINEZ,A.T.; BERGBAUER,M.; SZEWZYK,U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleorotus eryngii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.8, p.2788-2793, 1998.

HOFRICHTER,M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.454-466, 2002.

HU, T.L. Removal of reactive dyes from aqueous solution by diferent bacterial genera. **Water Sci. Technol**, v.34, p.89-95, 1996.

HU,T.L. Sorption of reactive dyes by Aeromonas biomass. **Water Sci. Technol**, v. 26,p. 357-366, 1992.

IMMICH,A.P.S.; SOUZA,A.A.U.; SOUZA,S.M.A.G.U. Removal of Remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. **Journal of Harzadous Materials**, v.164, p.1580-1585, 2009.

ISHIKAWA Y, ESKER T, LEDER A. Chemical economics handbook: dyes. **SRI Chemical and Health Business Services**, Menlo Park (CA), 2000.

JEFFRIES,T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes.**Biodegradation** , v.1, p.163–176, 1990.

JORDAAN, J; LEUKES, W.D. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic White rot fungus, **Enzyme and microbial technology**, v.33, n.2-3, p.212-219, 2003.

KAPDAN, I.K., KAPDAN, F. Comparison of white rot fungi cultures for decolorization of textile dyestuffs. **Bioprocess Engineering**, v.22, p. 347–351, 2002.

KNAPP,J.S.; NEWBY,P.S. e REECE,L.P. Decolorization of dyes by Wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.664-668, 1995.

KUMAR, M.N.V.R., SRIDHARI, T.R., BHAVANI, K.D., DUTTA, P.K. Trends in color removal from textile mill effluents, **Colorage**, v.40,p. 25-34, 1998.

KURBUS,T.; MARCHAL,A.M.;VONCINA,D.B. Comparison of H_2O_2/UV , H_2O_2/O_3 and H_2O_2/Fe^{2+} processes for the decolorisation of vinylsulphone reactive dyes. **Dyes and Pigments**, v.58, p.245-252, 2005.

LEONOWICZ, A., MATUSZEWSKA, A., LUTEREK .J., ZIEGENHAGEN, D., WOJTAS-WASILEWSKA, M., CHO, N.S., HOFRICHTER, M., ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genet Biol**, v.27, p.175–185, 1999.

MAHMOODI,N.M.; ARAMI,M.; LIMAE, N.Y.; TABRIZI,N.S. Kinetics of heterogeneous photocatalytic degradation of reactive dyes in an immobilized TiO_2 photocatalytic reactor. **Colloid and Interface Science**, v.295, p.159-164, 2006.

McMULLAN,G.; MEEHAN,C.; CONNEELY,A.; KIRBY,N.; ROBINSON,T.; NIGAM,P. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.81-87, 2001.

McMULLAN,G.; MEEHAN,C.; CONNELLY,A.; KIRBY,N.; ROBINSON,T.; MESTER,T.; FIELDJ.A. Characterization of novel manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjarkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.15412-15417, 1998.

MESTER,T.; TIEN,M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants.**International Biodeterioration and Biodegradation**, v.46, p.51-59, 2000.

MODAK, A., NATARAJAN, K.A. Biosorption of metals using non-living biomass: a review, **Min. Metall. Proc.**, Novembro, p.189-195, 1995.

MUNARI, F.M.; GAIO, T.A.; CALLONI, R.C.; DILLON, A.J.P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.8, p.1383-1392, 2007.

PALMIERI G, GIARDINA P, BIANCO C, FONTANELLA B, SANNIA G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl Environ Microbiol**, v.66, p.920–924, 2000.

PASZCZYNSKI, A.; PASTY-GRIGSBY, M.B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.11, p.3598-3604, 1992.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by White-rot-fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.57, p.20-33, 2001.

POLMAN, A.; BREKENRIDGE, C.R. Biomass-mediated binding and recovery of textile dyes from waste effluents. **Tex. Chem. Colour.**, v.28, p.31-35, 1996.

RAMALHO, P.A. **DEGRADATION OF DYES WITH MICROORGANISMS: STUDIES WITH ASCOMYCETE YEASTS**. 100p. Tese (Doutorado em Ciencias). Braga, Portugal: Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2005.

REDDY CA, D'SOUZA TM. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol Rev**, v.13, p.137–152, 1994.

RIVA, S. Lacases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v.24, n.5, p.219-226, 2006.

ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment Technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v.77, p.247-255, 2001.

RUIZ-DUENAS FJ, GUILLEN F, CAMARERO S, PEREZ-BOADA M, MARTINEZ MJ, MARTINEZ AT. Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Appl Environ Microbiol**, v.65, p.4458–4463, 1999.

SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; LIER, J.B. Review paper on current technology for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic technology. **Bioresource Technology**, v.98, p.2369-2385, 2007.

SUAY,I.; ARENAL,F.; ASENSIO,F.J.; BASILIO,A.; CABELLO,M.A.; DIEZ,M.T.; GARCIA,J.B.; DEL-VAL,A.G. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.78, p.129-139, 2000._

TAYLOR,J.B.; GUY,E.M. Biological control of root-infecting basidiomycetes by species of *Bacillus* and *Clostridium*. **The New Phytologist**, v.87, p.729-732, 1981.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology** , v.140, p.19–26, 1994.

TRUPKIN,S.; LEVIN,L.; FORCHIASSIN,F.; VIALE,A. Optimization of a culture médium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.682-690, 2003.

TSEZOS, M., BELL, J.P. Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass. **Water Res**, v.23,p. 561-568, 1989.

VENKATARAMAN, K.; The Chemistry of Synthetic Dyes. The Reactive Dyes; **Academic Press**; New York, v.3 (1970), v.7 (1974).

VONCINA,D.B.; LE-MARECHAL,A.M. Reactive dyes decolorization using combined ultrasound/ H₂O₂. **Dyes and Pigments**, v.59, p.173-179, 2003.

WARIISHI, H., VALLI, K., GOLD, M.H. Maganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.. **J Biol Chem**, v. 267, p.23688–23695, 1992.

YAMANAKA,R.; SOARES,C.F.; MATHEUS,D.R.; MACHADO,K.M.G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.78-84, 2008.

YOUNG,H.D.; HAH,Y.C.; KANG,S.O. Role of lacase in lignin degradation by White-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v132, p.183-185, 1995.

Mushroom observer. Disponível em:

http://mushroomobserver.org/name/show_name/1104. Acesso em:24 de junho de 2009.

Historia da Industria de Corantes. Disponível em:

<http://www.colorantshistory.org/home.html>. Acesso em 24 de junho de 2009.